

Université de Sherbrooke

Impact du glyoxal sur la signalisation du récepteur de l'angiotensine II de type 1

Par
Sophie Touchette
Programme de pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)
en pharmacologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Mars 2020

Membres du jury d'évaluation
Pr Michel Grandbois, programme de pharmacologie
Pr Jean-Luc Parent, programme de pharmacologie
Pr Fernand-Pierre Gendron, programme de biologie cellulaire

© Sophie Touchette, 2020

RÉSUMÉ

Impact du glyoxal sur la signalisation du récepteur de l'angiotensine II de type 1

Par

Sophie Touchette

Programme de pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en pharmacologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Les produits de glycation avancée (PGA) sont des composés formés suite à la réaction non-enzymatique de métabolites de sucres réducteurs, tels que le glucose et le fructose avec les résidus lysine et arginine des protéines. Cette réaction est exacerbée chez les sujets diabétiques présentant une hyperglycémie chronique. Le glyoxal (GO) est un métabolite important de la glycolyse et un niveau élevé et soutenu de celui-ci pourrait être associé au développement de l'hypertension artérielle. Le récepteur de l'angiotensine II de type 1 (AT₁R), un élément important dans la régulation de la tension artérielle, possède de nombreux résidus lysine et arginine susceptibles d'être modifiés par le GO. Or la modification de ces résidus pourrait affecter la liaison du récepteur avec l'agoniste Angiotensine II (AngII), son activation, ou encore son couplage avec les protéines-G et les β -arrestines. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons, dans un premier temps, réalisé des expériences de signalisation cellulaire à partir d'un essai intégré de la réponse cellulaire, afin d'évaluer l'impact d'une exposition au GO, sur la réponse cellulaire médiée par l'AngII, de cellules HEK293 surexprimant de façon stable AT₁R (HEK293-AT₁R). Les résultats obtenus indiquent une diminution de l'activation des voies G_{12/13}/Rho/ROCK, G_{q/11} et ERK1/2-dépendantes. De façon plus ciblée, nous avons évalué l'activation de la voie MAP kinase ERK1/2 à l'aide de l'essai AlphaScreen, ainsi que la production des inositols phosphates (voie G_q) grâce à la trousse IP-One. Nous avons également évalué avec des biosenseurs BRET, le recrutement de la β -arrestine 2 ainsi que l'activation de la voie G_q. Nous avons ensuite mesuré les propriétés de liaison de l'AngII à AT₁R par des essais de liaison en présence de GO. Dans le but d'observer la modification dépendante du GO sur le récepteur, nous avons réalisé des expériences d'immunoprécipitation-immunobuvardage sur les cellules HEK293-AT₁R traitées au GO. Ces cellules ont révélé la formation de dérivés carboxyméthyllysine (CML) au niveau de protéines cellulaires. Finalement, nous avons tenté d'identifier les résidus lysine et arginine glyqués sur AT₁R à partir d'expériences en spectrométrie de masse. De façon générale, nos résultats suggèrent que l'exposition au GO des cellules HEK293-AT₁R entraîne une diminution de l'activation des voies de signalisation par l'essai intégré de la réponse cellulaire, une diminution de la puissance pour l'ensemble des voies de signalisation étudiées, une diminution de l'efficacité pour l'activation des voies G_q et ERK1/2 ainsi qu'une diminution de l'affinité de l'AngII pour AT₁R.

Mots clés : AT₁R, Angiotensine II, Produits de glycation avancée, Glycation, Signalisation.

TABLE DES MATIÈRES

1. Introduction.....	1
1.1 Le diabète de type 2 et l'hypertension artérielle ; un lien direct?	3
1.1.1 Le diabète de type 2.....	3
1.1.2 L'hypertension artérielle	4
1.2 Les produits de glycation avancée (PGA)	5
1.2.1 Formation des PGA.....	5
1.2.2 Les dicarbonylés.....	7
1.2.3 Le système glyoxalase	10
1.3 L'hypertension artérielle et le diabète de type 2.....	11
1.4 Le système rénine-angiotensine.....	13
1.4.1 L'angiotensine II	13
1.4.2 Les effets physiologiques de l'angiotensine II.....	13
1.4.3 Récepteur à l'angiotensine II de type 1 (AT ₁ R).....	14
1.5 La signalisation d'AT₁R	15
1.5.1 Voies dépendantes des protéines-G.....	16
1.5.2 Voies indépendantes des protéines-G.....	17
1.6 Glycation de récepteurs par le GO et le MGO	18
1.7 Glycation du récepteur AT₁ de l'angiotensine II.....	20
2. HYPOTHÈSE/PROBLÉMATIQUE.....	23
Objectifs.....	23
3. MATÉRIEL ET MÉTHODE	24
3.1 Culture cellulaire	24
3.2 Plasmides et constructions de biosenseurs pour les expériences BRET	24
3.3 Transfections et biosenseurs BRET	25
3.4 Essai intégré de la réponse cellulaire	27
3.5 Essai AlphaScreen.....	27
3.6 L'essai IP-One	28
3.7 Expériences de liaison	29
3.8 Expériences d'immunobuvardage	30
3.9 Spectrométrie de masse	30
3.10 L'analyse des données	31

4. RÉSULTATS.....	32
4.1 L'exposition des cellules HEK293-AT ₁ R aux traitements GO/BBGC modifie la réponse cellulaire médiée par l'AngII	32
4.2 Les niveaux de phosphorylation ERK1/2 sont modifiés lorsqu'AT ₁ R est traité avec GO/BBGC.....	36
4.3 L'étude de la signalisation en aval des protéines-G révèle un couplage moins fonctionnel avec G _q lorsqu'AT ₁ R est traité avec GO/BBGC.....	38
4.4 L'activation de G _q est réduite en présence des traitements GO/BBGC	41
4.5 Le recrutement de β -arrestine 2 est réduit en présence des traitements GO/BBGC	42
4.6 Propriétés de liaison de l'AngII en présence et en l'absence de traitement par le GO/BBGC.....	45
4.7 Formation de dérivés CML de protéines cellulaires par expériences d'immunobuvardage	46
4.8 Formation de dérivés CML sur AT ₁ R	48
4.9 Identification des résidus glyqués sur AT ₁ R par spectrométrie de masse	49
5. DISCUSSION.....	53
5.1 Évaluation de la réponse cellulaire suivant l'activation d'AT ₁ R en présence de GO par un essai intégré de signalisation cellulaire (impédance)	53
5.2 Évaluation de l'impact du GO sur l'activation des voies de signalisation d'AT ₁ R .	54
5.3 Évaluation de l'impact du GO sur les propriétés de liaison de l'AngII à AT ₁ R.....	56
5.4 Évaluation de la glycation d'AT ₁ R par des expériences d'immunobuvardage et de spectrométrie de masse	57
6. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	60
7. LISTE DES RÉFÉRENCES	63

LISTE DES FIGURES

Introduction

Figure 1: Les produits de glycation avancée (PGA) découlant de la réaction de Maillard. ...	6
Figure 2: Formation endogène du méthylglyoxal (MGO), du glyoxal (GO) et des PGA.	7
Figure 3: La détoxification du méthylglyoxal intracellulaire par le système glyoxalase.	11
Figure 4: Mécanismes par lesquels l'hypertension artérielle et le diabète causent des maladies vasculaires.....	12
Figure 5: Le système rénine-angiotensine (SRA).....	13
Figure 6: Les effets physiologiques de l'angiotensine II.	14
Figure 7: Voies dépendantes des protéines-G.....	17
Figure 8: Voies indépendantes des protéines-G.....	18
Figure 9: La glycation du récepteur au PDGF β	20
Figure 10: Les résidus d'AT ₁ R potentiellement modifiés par le GO et les voies de signalisation canoniques du récepteur.	22

Matériel et méthode

Figure 11: Schéma représentant la mesure de l'activation de la voie G _q et β -arrestine par BRET.	26
Figure 12: Schéma représentant l'activation de la ERK1/2 évaluée par l'essai commercial AlphaScreen SureFire.	28
Figure 13: Schéma représentant la mesure de l'activation de la voie G _q avec l'essai IP-One ou Essai de FRET (Förster Resonance Energy Transfer).	29

Résultats

Figure 14: Contribution des voies G _{12/13} /Rho/ROCK, G _q et ERK1/2 en impédance.	33
Figure 15: Effet des expositions GO et BBGC sur la résistance de cellules HEK293-AT ₁ R par impédance.	35
Figure 16: Activation d'ERK1/2 par l'AngII après traitement par GO/BBGC mesurée avec l'essai commercial AlphaScreen SureFire de Perkin Elmer.	38
Figure 17: Effet de l'AngII sur la production des IP ₁ après traitement par GO/BBGC mesuré par l'essai IP-One.....	40

Figure 18: AngII favorise l'engagement de la protéine G_q avec ou sans traitement par le GO/BBGC.....	42
Figure 19: AngII conduit au recrutement de la β -arrestine 2 avec ou sans traitement par le GO/BBGC.....	43
Figure 20: Formation de dérivés CML de protéines cellulaires.	47
Figure 21: A. Immunoprécipitation du récepteur AT_1 . B. Absence de formation de dérivés CML sur AT_1R lors d'une exposition contrôle à une concentration faible en glucose (CTL, 5 mM) puis au glyoxal (GO, 1 mM) et/ou BBGC (5 μ M).....	49
Figure 22: Diagramme à serpent d' AT_1R montrant dans les encadrés les résidus lysine (K) et arginine (R) d' AT_1R révélés par spectrométrie de masse et impliqués dans le couplage des protéines-G (mauve) et la liaison des β -arrestines (rouge).....	51

Conclusions et perspectives

Figure 23: Diagramme à serpent d' AT_1R résumant la puissance, l'affinité et l'efficacité pour les voies de signalisation d' AT_1R étudiées en présence de GO, ainsi que l'activation des voies de signalisation en impédance.	61
---	----

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION

Tableau 1: Les principaux PGA et leur(s) mécanisme(s) de synthèse in vivo.	9
---	---

RÉSULTATS

Tableau 2 : Les valeurs du EC_{50} et E_{max} pour l'AngII sur les voies de signalisation activées par le récepteur AT_1 en présence et en absence de traitement GO (1 mM) et BBGC (5 μ M)	44
Tableau 3 Propriétés de liaison (K_d) de AngII à AT_1R et B_{max} en présence et en absence de traitement GO (1 mM) et BBGC (5 μ M).....	45
Tableau 4 : Séquences révélées d' AT_1R contenant des résidus lysines (K) et arginines (R), digéré avec la trypsine et la chymotrypsine.....	50
Tableau 5 Modifications glyoxal hydroimidazolone (G-H) sur le récepteur muscarinique M1 et sur le récepteur au glucagon.....	52

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AngI	Angiotensine I
AngII	Angiotensine II
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARA-II	Antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II
AT ₁ R	Récepteur de l'angiotensine II de type 1
AT ₂ R	Récepteur de l'angiotensine II de type 2
BBGC	S-p-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester, un inhibiteur de la glyoxalase, une enzyme responsable de la dégradation du glyoxal
CEL	Carboxyéthyllysine
CEA	Carboxyéthylarginine
CMA	Carboxyméthylarginine
CML	Carboxyméthyllysine
DAG	Diacylglycérol
DNID	Diabète non insulino-dépendant
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine
EGF	Facteur de croissance épidermique
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermique
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinases 1/2
G-H	Glyoxal-derived hydroimidazolone
GLUT4	Glucose transporter type 4
GO	Glyoxal
GOLD	Glyoxal derived lysine dimer
GLO-I	Glyoxalase I
GLO-II	Glyoxalase II
GRK	Kinase de récepteurs couplés aux protéines G
GSH	Glutathion
GTP	Guanosine triphosphate
GTPase	Enzyme qui catalyse l'hydrolyse de la guanosine triphosphate (GTP)
HbA1c	Hémoglobine glyquée

HEK293-AT ₁ R	Cellules embryonnaires rénales humaines 293 surexprimant de façon stable AT ₁ R
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphate
IR	Insulin receptor
IRS-1	Insuline receptor substrate 1
IRS-2	Insuline receptor substrate 2
Lys	Lysine
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	Map kinase kinase
MG-H	Méthylglyoxal hydroimidazolone
MGO	Méthylglyoxal
PDGF	Platelet-derived growth factor
PGA	Produits de glycation avancée
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PKB	Protéine kinase B
PKC	Protéine kinase C
PLC β	Phospholipase C bêta
PLC γ	Phospholipase C gamma
RAAS	The renin-angiotensin-aldosterone system
Raf	Protéine sérine/thréonine MAPK kinase kinase
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines-G
RhoA	Ras homolog family member A
ROCK	Rho-associated protein kinase
RTK	Récepteur tyrosine kinase
SRA	Système rénine-angiotensine
TM	Domaine transmembranaire

1. INTRODUCTION

Le diabète est une des maladies chroniques dont l'incidence croît le plus rapidement au Canada : en effet 200 000 nouveaux cas sont recensés chaque année dans des proportions de 9:1 pour le diabète de type 2 par rapport au diabète de type 1 ("Diabetes in Canada - Canada.Ca," n.d.). Le diabète de type 1 est caractérisé par une production insuffisante d'insuline par le corps suite à la destruction des cellules bêta des îlots de Langerhans du pancréas par le système immunitaire. Les cellules bêta sont responsables de produire l'insuline qui elle, régule l'absorption du glucose dans le sang via les transporteurs de glucose, tel que GLUT-4 (Huang and Czech 2007). Dans cette condition, l'organisme ne produit donc plus l'insuline nécessaire requise pour le métabolisme des glucides. Le diabète de type 2 est quant à lui, caractérisé par une résistance à l'insuline de l'organisme puisque les voies de signalisation du récepteur à l'insuline ne sont pas activées en dépit d'une production suffisante de l'hormone, ce qui entraîne une réduction du captage du glucose par la cellule. En conséquence, le taux de glucose sanguin devient alors anormalement élevé chez ces patients diabétiques, ce qui peut causer plusieurs problèmes de santé à long terme, en particulier les maladies cardiovasculaires et l'hypertension artérielle. L'hypertension artérielle (HTA) définit une condition clinique où la tension artérielle est supérieure à une norme qui correspond à un risque cardiovasculaire plus élevé. Actuellement, l'HTA est définie par des valeurs systoliques (TAS) ≥ 140 mmHg et/ou diastoliques (TAD) ≥ 90 mmHg dans la plupart des recommandations internationales (Campos-Nonato et al. 2018). L'hypertension artérielle augmente le risque d'accidents vasculaires cérébraux, de crises cardiaques et d'insuffisances rénales. En 2014, 17,7% des Canadiens (5.3 millions) de 12 ans et plus ont reçu un diagnostic d'hypertension artérielle ("Maladies Cardiovasculaires | Le Portail Canadien Des Pratiques Exemplaires - PCPE," n.d.). L'hypertension artérielle est un facteur de risque important de mortalité et d'incapacité, particulièrement chez les personnes atteintes de diabète. L'incidence de l'hypertension et du diabète chez les adultes canadiens a connu une hausse substantielle. En effet, plus de 62.8% d'adultes diagnostiqués avec le diabète ont également été diagnostiqués d'hypertension artérielle (Public Health Agency of Canada. 2010).

Parmi les hormones qui régulent la pression artérielle, on retrouve l'Angiotensine II (AngII), une hormone du système rénine-angiotensine dont les effets sont liés à la liaison et l'activation de son récepteur, le récepteur de l'angiotensine II de type 1, également connu sous le nom de récepteur AT₁ ou AT₁R. AT₁R appartient à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines-G et aux β -arrestines, activant une panoplie de voies de signalisation (Hu et al. 2010). En condition d'hyperglycémie, le récepteur AT₁ pourrait être potentiellement 'glyqué'. En effet, l'hémoglobine glyquée (ou HbA1c) sert de marqueur du risque de complications du diabète à long terme (Sherwani et al. 2016). La glycation est une réaction post-traductionnelle non-enzymatique entre des métabolites de sucres réducteurs, tels que le glucose et le fructose et les résidus lysine et arginine des protéines, formant des produits de glycation avancée (PGA). Cette réaction est exacerbée chez les sujets diabétiques présentant une hyperglycémie chronique. Les PGA peuvent également être formés par des métabolites de sucre hautement réactifs, tels que le glyoxal (GO) et le méthylglyoxal (MGO), qui à leurs tours, vont réagir avec des résidus lysine et arginine des protéines (Wetzels et al. 2017). Les niveaux élevés de GO et MGO pourraient être directement associés au développement de l'hypertension artérielle chez des patients atteints d'hyperglycémie chronique. L'AT₁R, un élément important dans la régulation de la tension artérielle, possède de nombreux résidus lysine et arginine qui pourraient être modifiés par le GO. Or la modification de ces résidus est susceptible d'affecter la liaison du récepteur avec l'agoniste Angiotensine II (AngII), son activation, ou encore son couplage avec les protéines-G et les β -arrestines. Cette glycation pourrait ainsi avoir un effet marqué sur la structure et la fonction du récepteur.

Le présent mémoire vise dans un premier temps, à évaluer l'impact de cette glycation sur le profil d'activation des voies de signalisation d'AT₁R et dans un deuxième temps, observer la glycation du récepteur.

1.1 Le diabète de type 2 et l'hypertension artérielle ; un lien direct?

1.1.1 Le diabète de type 2

Le diabète de type 2, diabète non insulino-dépendant (DNID) ou encore diabète sucré, est le diabète le plus courant: 90% des sujets diabétiques souffrent de diabète de type 2. Le patient atteint de diabète de type 2 devient résistant à l'action de l'insuline produite par les cellules bêta des îlots de Langerhans du pancréas. L'insuline ne peut donc plus adéquatement stimuler la conversion des glucides en acides gras dans les tissus adipeux. Les tissus où l'on retrouve une sensibilité réduite à l'insuline sont majoritairement le muscle squelettique, le foie et le tissu adipeux qui deviennent désensibilisés suite à une exposition à des concentrations élevées de glucose et engendrant ainsi une hyperglycémie chronique (Forbes and Cooper 2013).

L'incidence de la maladie a pris de l'ampleur dans les pays industrialisés notamment dû à une diète plus élevée en sucres, associée également à l'obésité. La diète n'est pas le seul facteur du diabète de type 2 et plusieurs facteurs environnementaux et génétiques sont aussi à l'origine de la maladie (Forbes and Cooper 2013). Le diagnostic du diabète de type 2 est basé sur une hyperglycémie révélée par deux tests distincts; la concentration de glucose ou par la quantification de la glycation de protéines plasmatiques. Le test de glucose plasmatique doit être fait après un jeûne de 8 à 10 heures. Le taux de glucose pour une personne en santé est en dessous de 6.1 mmol/l et de 7.0 mmol/l et plus pour un sujet atteint du diabète de type 2, (Cox and Edelman 2009). La mesure de l'HbA1C, qui correspond à la forme glyquée de l'hémoglobine et dont la valeur sert à déterminer la concentration de glucose dans le sang, doit être supérieure ou égale à 6.5% (Vijan 2010).

Plusieurs complications sont associées au diabète de type 2 : les complications macrovasculaires telles que les maladies coronariennes, les maladies des artères périphériques, les maladies cardiovasculaires et les complications microvasculaires comme la néphropathie diabétique, les neuropathies ou encore la rétinopathie (Fowler 2008). La rétinopathie est la complication microvasculaire la plus commune et est responsable de 10

000 cas de cécité par année aux États-Unis (Jeng et al. 2016). Les complications associées au diabète de type 2 ont un impact réel sur la qualité de vie de ceux qui en sont affectés et sont la cause d'un grand taux de mortalité. L'hypertension artérielle est une autre maladie associée au diabète. En effet, le diabète augmente le risque d'hypertension artérielle, de maladie cardiaque et d'accident vasculaire cérébral, contribuant ainsi aux complications associées au diabète.

1.1.2 L'hypertension artérielle

L'hypertension artérielle est un facteur de risque associé à des maladies cardiovasculaires et est caractérisée par une élévation anormale de la pression du sang circulant dans les artères. La pression artérielle représente la force à laquelle le sang est poussé contre la paroi des artères lorsque le cœur pompe le sang à travers le corps. Chez un individu sain, la pression systolique correspond à la force exercée lorsque le cœur se contracte et expulse le sang et est moins de 120 mm Hg, tandis que la pression diastolique, représentant la pression lorsque le cœur se détend entre deux battements, est moins de 80 mmHg. L'hypertension artérielle est diagnostiquée chez un sujet si la pression systolique est égale ou supérieure à 140 mm Hg (Rodriguez et al. 2014).

Les traitements contre l'hypertension artérielle sont variés et consistent en une prise d'antihypertenseurs qui réduisent la pression artérielle. Parmi les agents thérapeutiques les plus utilisés pour le traitement de cette condition, nous retrouvons les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'Angiotensine (ECA). Ces inhibiteurs inhibent l'ECA et bloquent la conversion de l'AngI à l'AngII entraînant ainsi une diminution des effets liés à la synthèse d'angiotensine II, tels qu'une diminution de la vasoconstriction des artéioles. Nous retrouvons également comme traitement les antagonistes des récepteurs de l'Angiotensine II (ARA-II) qui bloquent la liaison de l'AngII sur AT_1R . Si la pression artérielle optimale n'est pas atteinte avec ces inhibiteurs, la deuxième ligne thérapeutique la plus utilisée est l'utilisation de diurétiques thiazidiques. Les bloqueurs de récepteurs β -adrénergiques, quant à eux, sont prescrits à des patients diabétiques avec des antécédents d'infarctus du myocarde, d'arrêt cardiaque, de maladie de l'artère coronaire et des angines. Les bloqueurs de canaux

calciques sont aussi un autre traitement contre l'hypertension artérielle et sont prescrits aux patients qui sont atteints de diabète et qui ne peuvent tolérer la prise des agents thérapeutiques mentionnés ci-dessus (Poirier and Tobe 2014).

Il est notable d'observer qu'une majorité de personnes atteinte du diabète de type 2 souffre aussi d'hypertension artérielle (Forbes and Cooper 2013). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le développement de l'hypertension artérielle chez les sujets diabétiques et impliquent le système rénine-angiotensine (SRA). En effet, plusieurs essais cliniques ont démontré que des traitements avec des inhibiteurs du SRA tels que les inhibiteurs ECA ou les ARA, ont potentiellement réduit l'incidence de développer l'hypertension artérielle chez des patients atteints de diabète de type 2 (Karin Am Jandeleit-dahm 2005). Dans une autre étude *in vivo* chez le rat, il a été prouvé que l'AngII inhibe la liaison d'IRS-1 et IRS-2, les récepteurs à l'insuline, à la PI3-kinase lorsque l'insuline lie ses récepteurs (Folli et al. 2009). De plus, il semblerait qu'une augmentation dans l'activité de SRA implique le développement de cardiomyopathie diabétique et néphropathie diabétique (Hunyady and Catt 2006a).

Ce mémoire porte sur l'évaluation potentielle de l'impact des produits de glycation avancée (PGA) sur la signalisation d'AT₁R et qui, avec l'AngII, jouent un rôle important dans la régulation de la pression artérielle. La formation et les mécanismes d'action des PGA, seront présentés dans le chapitre suivant.

1.2 Les produits de glycation avancée (PGA)

1.2.1 Formation des PGA

Les PGA sont des composés formés par la réaction non-enzymatique et post-traductionnelle entre le groupement amine primaire (lysine ou arginine) d'une protéine et le groupement carbonyle d'un sucre réducteur (tel que le glucose, le fructose, le mannose ou encore le galactose), pour former un intermédiaire instable, la base de Schiff (Wautier and Schmidt 2004). Cette réaction est réversible et se déroule sur plusieurs heures. La base de Schiff va à

son tour, subir plusieurs réarrangements pour devenir un produit plus stable, connu sous le nom de produit d'Amadori ou produit de glycation précoce; cette réaction a lieu sur plusieurs jours (Wautier and Schmidt 2004). Les produits d'Amadori peuvent former de façon irréversible une variété de PGA à travers une série de transformations impliquant des réactions d'oxydation, de réduction, de fragmentation ou encore de cyclisation. Ces composés peuvent se former sur une seule protéine ou encore entre deux protéines, entraînant ainsi leurs réticulations (**Figure 1**).

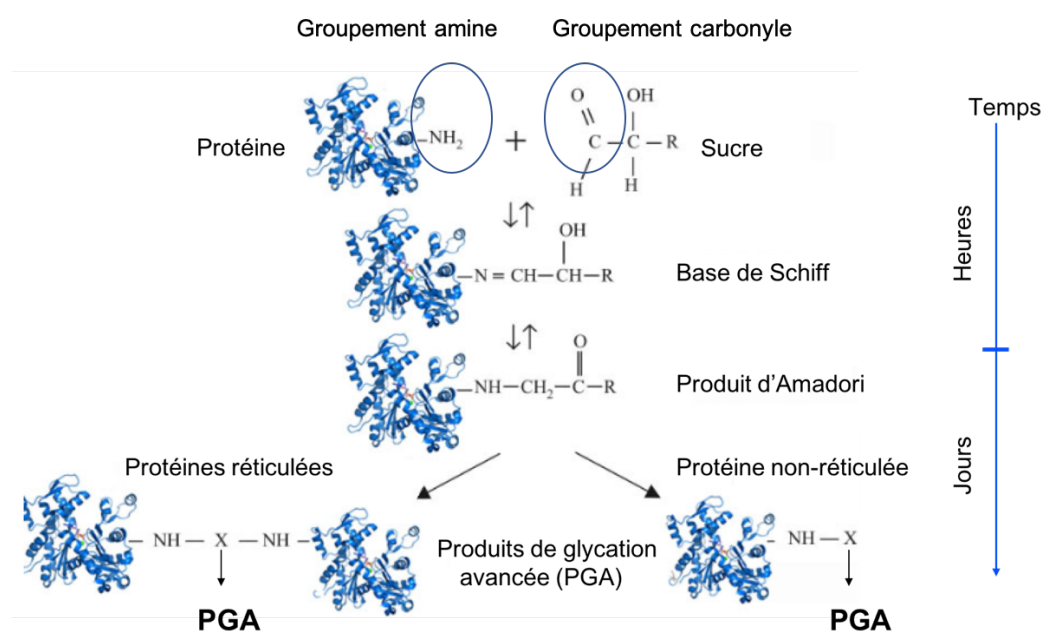


Figure 1: Les produits de glycation avancée (PGA) découlant de la réaction de Maillard. Les PGA proviennent de la réaction entre un groupement amine primaire d'une protéine et le groupement carbonyle d'un sucre réducteur, générant un intermédiaire instable, la base de Schiff, qui se réarrange vers le produit d'Amadori. Ce dernier est propice à d'autres réarrangements formant ainsi de façon irréversible, toute une variété de PGA. Ces composés peuvent se former sur une seule protéine ou entre deux protéines, générant leurs réticulations. (X= PGA). Adapté de Lapolla et al., 2005 (Lapolla, Traldi, and Fedele 2005).

1.2.2 Les dicarbonylés

Plusieurs molécules, telles que les glucides (exemple : glucose et fructose), peuvent induire la glycation et former des PGA comme mentionné dans la section précédente, mais aussi d'autres intermédiaires de glycation comme des dicarbonylés hautement réactifs. Des dicarbonylés tel que le **glyoxal (GO)** et le **méthylglyoxal (MGO)** sont présents *in vivo* et peuvent également réagir avec les résidus lysine et arginine des protéines pour former une variété de PGA (**Figure 2**). Le MGO est formé par la glycolyse tandis que le GO est essentiellement formé suite à l'auto-oxydation de sucres réducteurs. De façon intéressante, il a été observé que les dicarbonylés réagissent davantage avec les résidus arginines des protéines, tandis que les sucres réagissent plutôt avec les groupements lysines (Rabbani and Thornalley 2014) (Paul J Thornalley 2008).

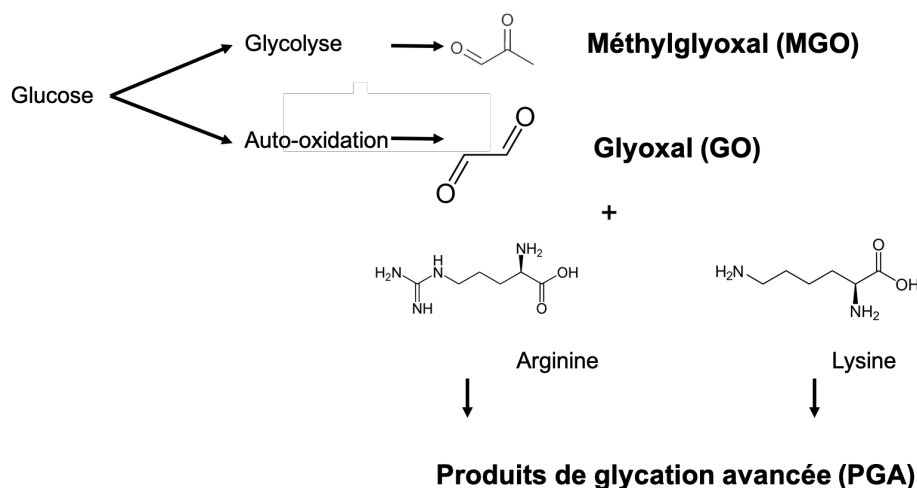
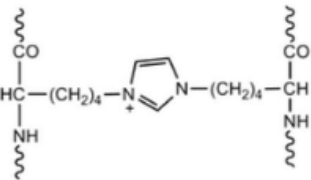
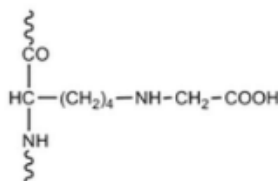
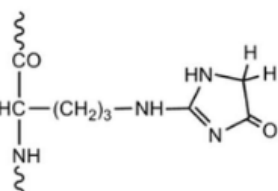
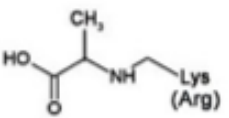
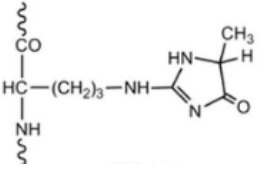


Figure 2: Formation endogène du méthylglyoxal (MGO), du glyoxal (GO) et des PGA. La glycolyse du glucose génère le MGO et l'auto-oxydation du glucose génère le GO. Ces dicarbonylés vont à leurs tours réagir au niveau des résidus lysine et arginine de protéines pour former des PGA.

Ainsi, la réaction du MGO avec les résidus lysine et arginine des protéines mène à la formation de PGA tels que le carboxyéthyllysine (CEL), le carboxyéthylarginine (CEA) et le méthylglyoxal hydroimidazolone (MG-H) (Allaman, Bélanger, and Magistretti 2015) (**Tableau 1**). Le GO, quant à lui, est retrouvé en forte concentration chez les patients diabétiques (Tan et al. 2008). La source endogène de GO est produite par la réaction

spontanée de groupements amine de protéines avec des sucres réducteurs, par l'auto-oxydation de sucres, par l'auto-oxydation de l'ADN, la peroxydation des lipides et en condition de stress oxydatif (Lange et al. 2012). Il a été rapporté que la concentration moyenne de GO sanguin chez l'humain en santé est de 1,1 μM comparativement à 4,5 μM chez les patients diabétiques (Mirza et al. 2007). Le GO est responsable de former plusieurs PGA tels que la formation du composé GOLD (*glyoxal-derived lysine dimer*), du glyoxal hydroimidazolone (G-H, *glyoxal-derived hydroimidazolone*), du carboxyméthyllysine (CML) et du carboxyméthylarginine (CMA). Les PGA formés par le MGO et le GO sont présentés dans le **Tableau 1**. Il est notable que 40 et 50% des PGA proviennent du GO sous forme de carboxyméthyllysine (CML) (Ruggiero-Lopez et al. 1999).

Tableau 1: Les principaux PGA et leur(s) mécanisme(s) de synthèse *in vivo*. Adapté de la thèse de J. Boucher, 2015 (Boucher 2015)

PGA	Synthèse <i>in vivo</i>
GOLD (glyoxal derived lysine dimer) 	Réaction de deux molécules de GO avec deux lysines (Grune, Catalgol, and Jung 2012) (Wells-Knecht et al. 1996).
N-carboxyméthyl-lysine (CML) ou arginine (CMA) 	Dégradation du produit d'Amadori ou réaction entre le GO et un résidu lysine ou arginine, ou encore l'oxydation du produit d'Amadori (Grune, Catalgol, and Jung 2012).
G-H (glyoxal hydroimidazolone) 	Produit de la réaction entre le GO et un résidu arginine (Niwa et al. 1997).
N-carboxyéthyl-lysine (CEL) ou arginine (CEA) 	Réaction entre le MGO et un résidu lysine ou arginine (Grune, Catalgol, and Jung 2012).
MG-H (méthylglyoxal hydroimidazolone) 	Produit de la réaction entre le MGO et un résidu arginine (Grune, Catalgol, and Jung 2012).

1.2.3 Le système glyoxalase

Le système glyoxalase est un système impliqué dans la détoxification du GO et du MGO au niveau intracellulaire et qui implique l'activité des enzymes glyoxalase I (GLO-I) et la glyoxalase II (GLO-II). GLO-I réagit avec les aldéhydes du MGO et GO au niveau du cytosol de la cellule et détoxifie celle-ci de ces métabolites. En effet, dans le cas du MGO intracellulaire, celui-ci réagit avec le glutathion (GSH) pour donner un hémithioacétal, converti en S-D-Lactoylglutathion par GLO-I, à son tour hydrolysé en D-lactate par GLO-II (**Figure 3**) et en glycolate pour la détoxification du GO (Maessen, Stehouwer, and Schalkwijk 2015). Le système glyoxalase permet de limiter les niveaux de GO et MGO intracellulaire. Toutefois, en condition d'hyperglycémie, on retrouve de fortes concentrations de GO et MGO chez des patients diabétiques qui ne peuvent pas être assez rapidement détoxifiés par le système enzymatique des glyoxalases, engendrant ainsi une augmentation de leurs concentrations (Lange et al. 2012). Le S-p-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester (BBGC) est un inhibiteur de GLO-I, perméable à la cellule (Paul J. Thornalley et al. 2002). Ainsi, une inhibition de GLO-I par le BBGC permet artificiellement d'engendrer une augmentation de la concentration de MGO et GO au niveau intracellulaire et ainsi fournir un modèle d'étude de l'impact de composés dicarbonylés sur la cellule.

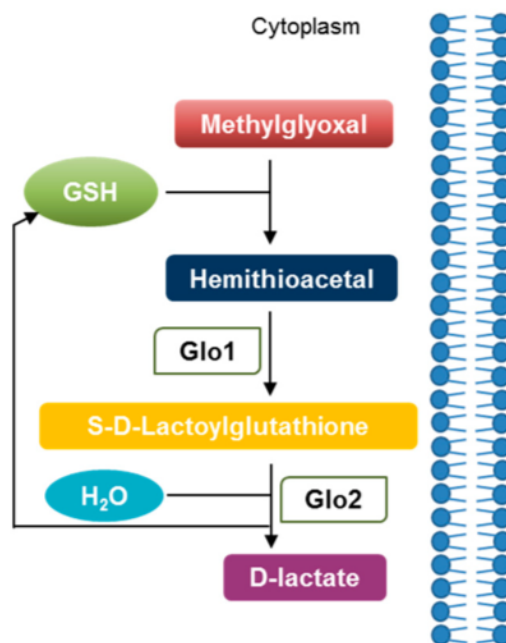


Figure 3: La détoxification du méthylglyoxal intracellulaire par le système glyoxalase. Antognelli et Talesa., 2018 (Antognelli and Talesa 2018).

1.3 L'hypertension artérielle et le diabète de type 2

Un lien direct semble exister entre l'hyperglycémie chronique et l'hypertension artérielle. Selon une étude effectuée sur la population américaine, l'hypertension artérielle a lieu chez 30% des patients atteints de diabète de type 1 et de 50% à 80% chez les patients atteints de diabète de type 2 (Landsberg and Molitch n.d.). Une autre étude aux États-Unis a démontré que les sujets atteints de diabète de type 2 ont 2.5 fois plus de chance de développer une l'hypertension artérielle que des personnes non-atteintes de la maladie (Gress et al. 2000). Chez les diabétiques, la principale cause de mortalité est la maladie cardiovasculaire exacerbée par l'hypertension (Petrie, Guzik, and Touyz 2018). Il pourrait donc exister un lien direct entre les deux conditions.

L'hypertension artérielle partage plusieurs mécanismes avec le diabète par lesquels ceux-ci causent des maladies microvasculaires et macrovasculaires, tels que RAAS, le stress oxydatif, l'inflammation, les micro-ARN, mais aussi l'hyperglycémie. En effet, l'hyperglycémie accélère la formation de PGA qui eux, participent au développement de maladies macrovasculaires et microvasculaires (**Figure 4**) (Petrie, Guzik, and Touyz 2018).

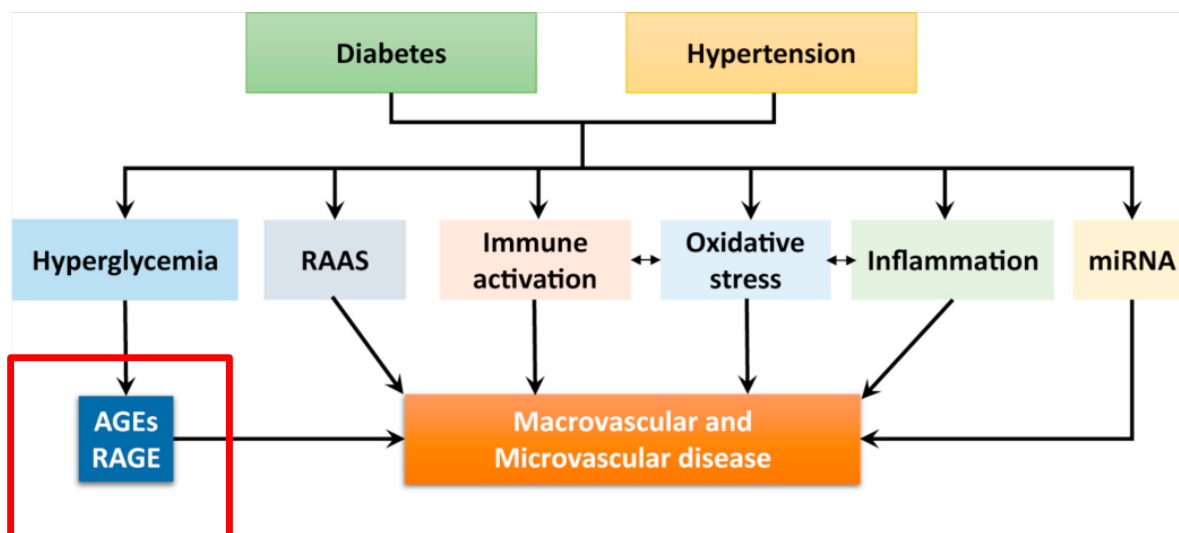


Figure 4: Mécanismes par lesquels l’hypertension artérielle et le diabète causent des maladies vasculaires. Les mécanismes sont l’inflammation et le stress oxydatif médiés par le stress oxydatif, les micro-RNA, le SRA et l’hyperglycémie. L’hyperglycémie accélère la formation de PGA. Adapté de Petrie et al., 2018 (Petrie, Guzik, and Touyz 2018).

Les PGA participent au développement de maladies macrovasculaires et microvasculaires associées au diabète telles que la rétinopathie, la néphropathie et la neuropathie. En effet, des études ont démontré qu’il y a une grande concentration de PGA, comme le CML, au niveau des microvaisseaux et des cellules gliales de la rétine de patients diabétiques (Murata et al. 1997). Dans le cas de néphropathie, il a été démontré que l’accumulation de PGA dans les glomérules et les néphrites tubulo-interstitielles corrélerent avec la sévérité de la néphropathie diabétique (Forbes et al. 2003).

Ainsi, puisque l’on observe une accumulation des PGA dans les complications associées au diabète et puisque l’hypertension est aussi une complication du diabète, il y-a-t-il une potentielle corrélation entre la formation anormale de PGA et l’hypertension artérielle?

1.4 Le système rénine-angiotensine.

1.4.1 L'angiotensine II

La tension artérielle est régulée par une hormone, l'angiotensine II, qui est l'hormone clé du système rénine-angiotensine. L'angiotensinogène est le précurseur de cette hormone et est un peptide inactif que l'on retrouve au niveau du foie et qui va être clivé par la rénine, une enzyme rénale stimulée lors d'une baisse de la pression au niveau de l'artère rénale pour produire l'angiotensine I (AngI). L'AngI, une protéine décapeptide inactive, sera hydrolysée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), sécrétée par l'endothélium pulmonaire, pour former le peptide actif, l'angiotensine II (AngII) (**Figure 5**) (Hunyady and Catt 2006a). L'AngII est une hormone composée de huit acides aminés : Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe. Les effets physiologiques de l'AngII découlent de la liaison de l'hormone à son récepteur AT_1 , un récepteur de la famille des récepteurs couplés aux protéines-G (RCPG).

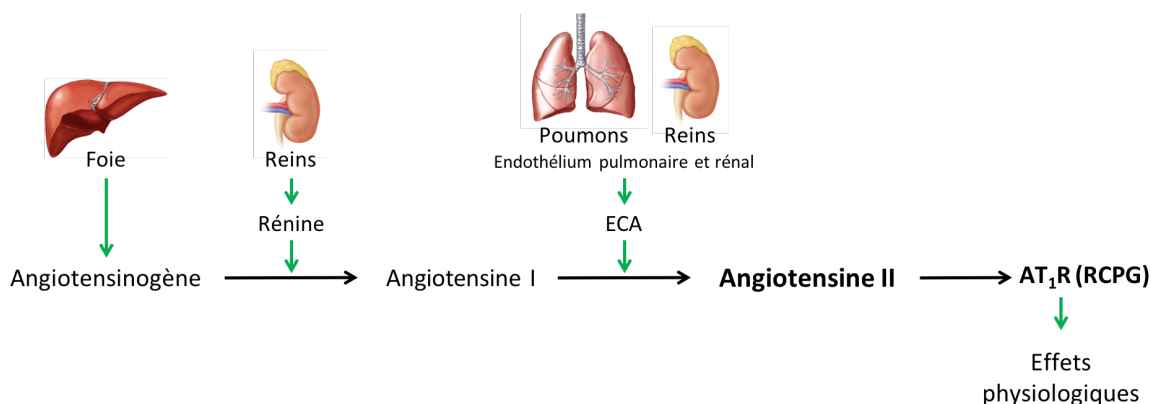


Figure 5: Le système rénine-angiotensine (SRA). Schéma représentant la production d'Angiotensine II. Adapté du mémoire de D. St-Pierre, 2017 (St-Pierre 2017).

1.4.2 Les effets physiologiques de l'angiotensine II

Le système rénine-angiotensine représente un système hormonal localisé dans le rein et qui a pour but de maintenir l'homéostasie entre les ions et l'eau. Ce système a pour fonction de réguler la pression artérielle par le couplage de l'AngII à son récepteur, AT_1R ; celui-ci est

responsable des effets physiologiques de ce système. L'AngII, une fois liant le récepteur, est responsable de l'élévation de la pression artérielle par plusieurs mécanismes. Tout d'abord, l'AngII favorise l'élévation de la pression artérielle par la vasoconstriction des artérioles ce qui augmente la résistance. L'AngII stimule la synthèse et le relâchement d'aldostérone par le cortex de la glande surrénale et favorise la réabsorption tubulaire de sodium (Na^+) et de chlore (Cl^-), puis de l'excrétion de potassium vers l'urine (K^+). L'AngII stimule également la sécrétion de la vasopressine (ADH) par le lobe postérieur de l'hypophyse, ce qui limite la perte d'eau dans l'urine. L'AngII est aussi impliquée dans l'augmentation du système nerveux sympathique en favorisant l'absorption d'eau et en augmentant le volume sanguin. Celle-ci a également un deuxième rôle important à jouer dans la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire (**Figure 6**) (Mehta and Griendling 2007).

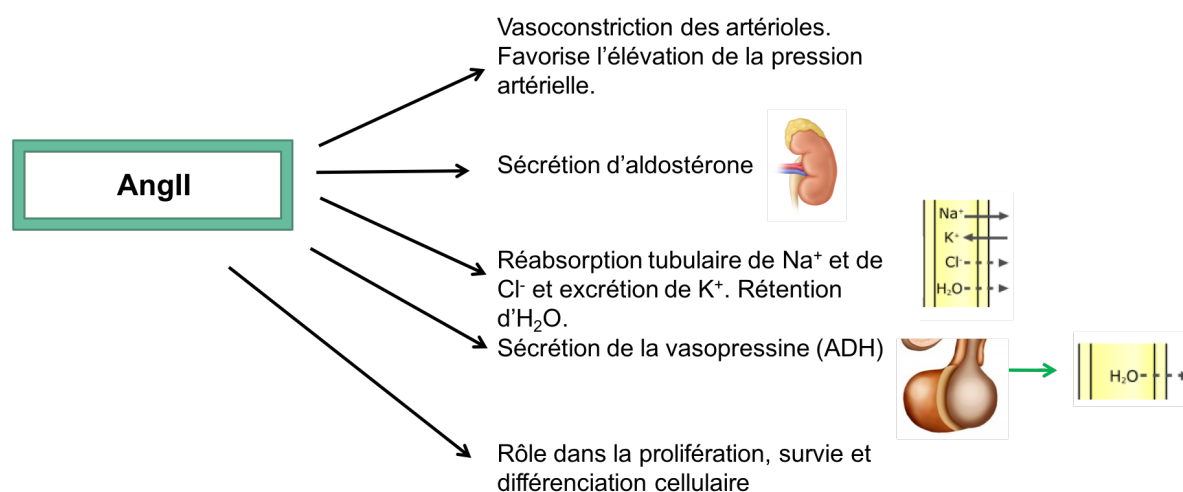


Figure 6: Les effets physiologiques de l'angiotensine II. Adapté du mémoire de D. St-Pierre, 2017 (St-Pierre 2017).

1.4.3 Récepteur à l'angiotensine II de type 1 (AT_1R)

Nous retrouvons deux récepteurs à l'AngII chez l'humain : le récepteur à l'angiotensine II de type 1 (AT_1R) et le récepteur à l'AngII de type 2 (AT_2R). AT_1R se trouve dans plusieurs types cellulaires, notamment au niveau des reins, du foie et des vaisseaux sanguins. AT_1R est un récepteur couplé aux protéines-G qui fait partie de la famille des RCPG. Celui-ci est

composé de 359 acides aminés et 7 hélices alpha hydrophobes qui sont connectées par trois boucles sur chaque côté de la membrane lipidique. AT₁R comporte un domaine N-terminal extracellulaire et un domaine C-terminal intracellulaire; ce dernier contient des sérines et thréonines qui peuvent être phosphorylés par les kinases de récepteurs couplés aux protéines G (GRK) (Shin-ichiro Miura 1999). Le poids moléculaire théorique d'AT₁R est de 41 kDa. Le gène codant le récepteur AT₁ de l'angiotensine II est *AGTR1*. Lorsqu'AT₁R lie son ligand l'AngII, le récepteur est désensibilisé et internalisé après stimulation par les arrestines. C'est un récepteur transmembranaire constitué de 7 hélices transmembranaires. Les acides aminés essentiels à la liaison de l'AngII à AT₁R se retrouvent surtout dans le domaine N-terminale et dans la première et troisième boucle extracellulaire (TM3 et TM6) et incluent les résidus cystéines qui forment les ponts disulfures. Les résidus chargés et situés dans les domaines transmembranaires, qui participent à la liaison du peptide sont les lysines Lys-102^(3.26) dans le haut de TM3 et Lys-199^(5.42) dans le haut de TM5 (de Gasparo et al. 2000a). De plus, le mouvement de TM3 et TM6 joue un rôle majeur dans l'activation du récepteur; en effet, lorsque AT₁R lie son ligand, un éloignement se produit entre TM3 et TM6, ce qui permet le couplage des protéines-G; le récepteur se trouve dans une conformation active (Balakumar and Jagadeesh 2014).

1.5 La signalisation d'AT₁R

Lorsque le récepteur AT₁ lie son agoniste l'AngII, il y a activation des principales voies canoniques du récepteur, principalement G_{αq/11} qui active les phospholipases A2, C et D et régule le calcium intracellulaire, G_{α12/13} impliquée dans le remodelage du cytosquelette et G_{αi/o} qui inhibe la production de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Il est connu qu'AT₁R a une signalisation indépendante de celle couplée aux protéines-G; en effet, lorsqu'AT₁R lie son ligand, il y a aussi recrutement des β-arrestines (β-arrestine 1 et β-arrestine 2), l'activation du récepteur à l'EGF (EGFR) et l'activation de MAP kinases (MAPK). La liaison de l'AngII à AT₁R est aussi impliquée dans l'activation des kinases de la famille Jak/STAT et Src (Hunyady and Catt 2006a).

1.5.1 Voies dépendantes des protéines-G

Le couplage de $G_{\alpha q/11}$ à AT_1R active la phospholipase C bêta ($PLC\beta$), une enzyme qui hydrolyse le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) en diacylglycérol (DAG) et en inositol-1,4,5-trisphosphate (IP_3) (**Figure 7**). Le DAG est requis pour l'activation des protéine kinase C (PKC) classiques et nouvelles tandis que l' IP_3 lie son récepteur au niveau du réticulum endoplasmique et provoque une élévation du calcium intracellulaire (Ca^{2+}) dans le cytosol. La relâche de ce calcium stimule la contraction musculaire lisse et est un élément important dans la régulation de la tension artérielle. L'activation de la voie ERK1/2 peut se faire de façon dépendante de la protéine $G_{\alpha q/11}$, précisément via PKC, qui entraîne l'activation de la cascade de kinases Raf, MEK et ERK1/2. De plus, AT_1R interagit avec la protéine hétérotrimérique $G_{\alpha i/o}$ qui inhibe l'adénylate cyclase et ainsi diminue la concentration d'AMPc. AT_1R interagit aussi avec $G_{\alpha 12/13}$ qui active la GTPase RhoA et la protéine kinase ROCK ayant un rôle dans la réorganisation du cytosquelette (Hunyady and Catt 2006a).

L'AngII active également plusieurs réponses secondaires associées à la stimulation de facteurs de croissance et régule la prolifération cellulaire, la croissance des cellules, la migration cellulaire, l'apoptose et l'expression d'une panoplie de différents gènes. Cette stimulation découle de l'activation induite par l'AngII de tyrosines kinases cytoplasmiques (par exemple, Pyk2, c-Src, Tyk2, FAK, Jak2) (Hunyady and Catt 2006a).

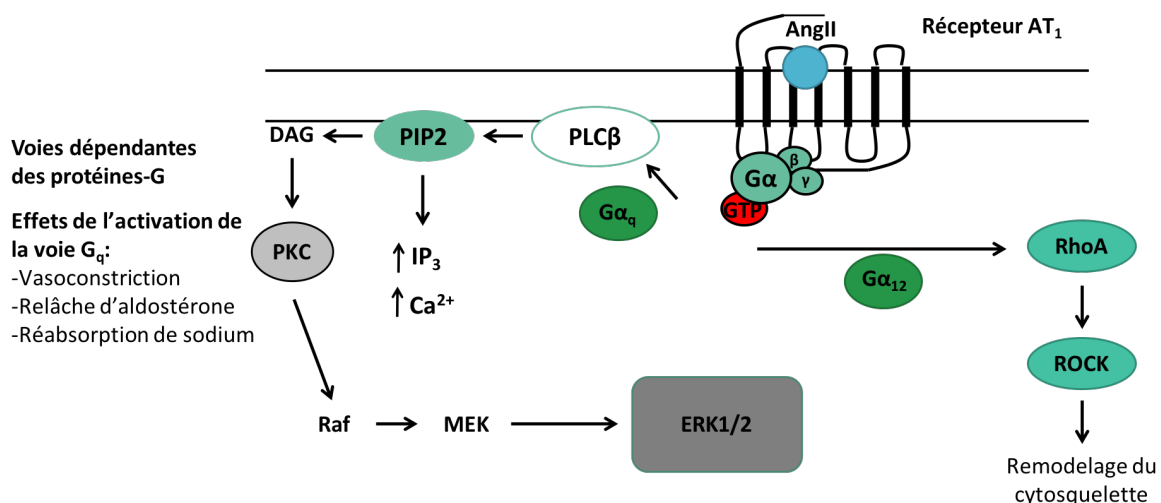


Figure 7: Voies dépendantes des protéines-G. Schéma représentant les différentes voies de signalisation qu' AT_1R peut activer de manière dépendante des protéines-G.

1.5.2 Voies indépendantes des protéines-G

AT_1R activé par l'AngII peut aussi déclencher la transduction d'un signal indépendant de l'activité de protéines-G, en s'associant avec d'autres éléments tels que les tyrosine kinases et les β -arrestines. En effet, la stimulation des RCPG et la phosphorylation des résidus sérine et thréonine de la queue C-terminale par les GRKs, empêche la liaison et donc la signalisation dépendante des protéines-G. Ceci va entraîner le recrutement des β -arrestines (β -arrestine 1 et β -arrestine 2) qui sont connues pour permettre la terminaison du signal via les protéines-G. Les arrestines sont des protéines qui se lient au récepteur phosphorylé, arrêtent le couplage des protéines-G au récepteur et engendrent l'internalisation du récepteur; ce processus se nomme désensibilisation homologue, puisqu'il est dépendant de la liaison de l'agoniste au récepteur (Hunyady and Catt 2006a). L'activation d'ERK1/2 peut être indépendante des protéines-G suite au recrutement des arrestines. En effet, la formation de complexes stables entre AT_1R et les β -arrestines (β -arrestine 1 et β -arrestine 2) engendre l'activation de la voie ERK1/2 et une augmentation de l'activation des MAP kinases (**Figure 8**) (Hunyady and Catt 2006b).

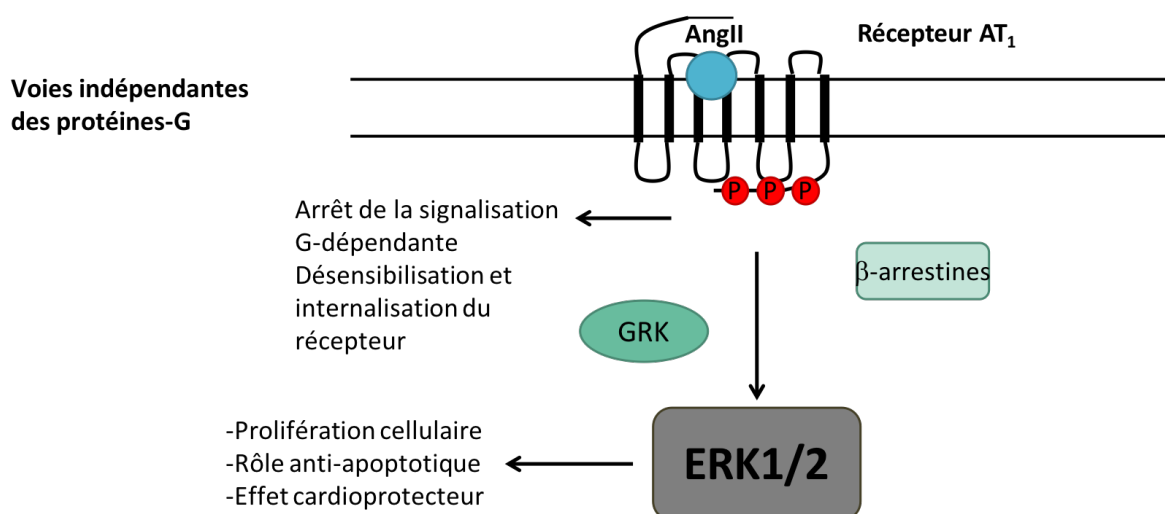


Figure 8: Voies indépendantes des protéines-G. Schéma représentant les différentes voies de signalisation qu'AT₁R peut activer de façon indépendante des protéines-G.

1.6 Glycation de récepteurs par le GO et le MGO

Puisque la formation de PGA, des composés formés par la réaction non enzymatique entre un sucre et la fonction amine libre d'une protéine, est exacerbée chez les sujets diabétiques souffrants d'hyperglycémie, il serait intéressant de voir si le récepteur AT₁ pourrait être une cible dans la formation de PGA en présence de GO. En effet, nous envisageons la glycation du GO dépendante comme une modification post-traductionnelle non-enzymatique qui pourrait moduler l'activité du récepteur ou encore la liaison de l'agoniste AngII.

Nous avons émis cette hypothèse puisque dans la littérature, il a été démontré que plusieurs récepteurs tyrosines kinases sont modifiés en présence de GO et MGO, notamment le récepteur à l'EGF, le récepteur à l'insuline ou encore le récepteur au PDGFβ. Le récepteur à l'EGF est un récepteur impliqué dans la liaison au facteur de croissance épidermique, provoquant une activité mitotique très rapide au sein de plusieurs tissus. Il a un rôle important à jouer dans la prolifération, la survie, la différenciation et la migration cellulaire et appartient à la famille des récepteurs tyrosines kinases (RTK) (Wieduwilt and Moasser 2008). Dans une étude antérieure, il a été démontré que le récepteur à l'EGF est modifié lorsqu'exposé au GO

et au MGO par la formation de dérivés CML sur le récepteur, révélée par essais d'immunoprécipitation et immunobuvardage. En effet, il a été démontré que l'exposition au GO et MGO empêchent la phosphorylation des tyrosines dans le domaine cytoplasmique du récepteur à l'EGF, le recrutement de protéines effectrices responsables de la signalisation telles que la phospholipase C gamma (PLC γ) et la phosphorylation d'ERK1/2 (Portero-Otín et al. 2002). Le récepteur à l'insuline (IR) a aussi été démontré comme étant sensible à des modifications par le MGO. Lorsque l'insuline lie IR, celui-ci active un complexe intracellulaire important dans la signalisation à travers la protéine d'échafaudage IRS et l'activation des voies canoniques PI3K et ERK1/2 (De Meyts 2000). L'exposition d'IR au MGO empêche la phosphorylation d'un résidu sérine de la protéine d'échafaudage IRS et le recrutement de protéines effectrices responsables de la signalisation puisqu'on observe une diminution de la phosphorylation des protéines kinases B (PKB) et ERK1/2 ainsi qu'une diminution de l'activité de PKB (Riboulet-Chavey et al. 2006b).

Il a également été démontré que le récepteur au PDGF β (PDGFR β) est modifié suite à une exposition à des concentrations non-toxiques de GO et MGO. PDGFR β est un récepteur qui lie le facteur de croissance PDGF β , impliqué dans la croissance et la division cellulaire, mais aussi dans la formation de vaisseaux sanguins, la prolifération de cellules mésenchymateuses telles que les fibroblastes, les ostéoblastes, les cellules des muscles lisses, etc. Dans une étude réalisée au préalable, il a été démontré que le PDGFR β est modifié lorsqu'exposé à différentes concentrations de GO et MGO, par la formation de CML et CEL respectivement, sur le récepteur. En effet, lorsque traité avec du GO, la formation de CML sur le récepteur immunoprécipité de cellules du muscle lisse, mais aussi une inhibition de l'activité tyrosine du récepteur et de la phosphorylation d'ERK1/2 ont été observés. Les auteurs de cette étude suggèrent qu'en condition d'hyperglycémie, on retrouve une concentration sanguine très haute de GO, ce qui va former des dérivés CML sur PDGFR β , empêchant son activité tyrosine kinase et l'activation des voies canoniques du récepteur telles que la phosphorylation d'ERK1/2 (Cantero et al. 2007) (**Figure 9**).

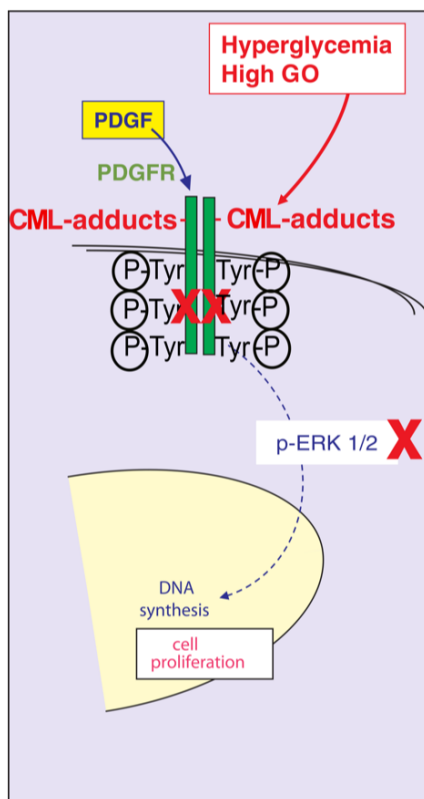


Figure 9: La glycation du récepteur au PDGF β . Schéma représentant la glycation du récepteur au PDGF β par la formation de CML sur le récepteur, l'inhibition de son activité tyrosine kinase et de l'activation des voies canoniques du récepteur telles que la phosphorylation d'ERK1/2. Adapté de Cantero et al., 2007 (Cantero et al. 2007).

Puisque certains récepteurs tyrosines kinases sont modifiés au niveau des résidus, notamment le récepteur au PDGF β , par la formation de CML qui inhibe l'activation et module l'activation de ses voies de signalisation, il serait intéressant de vérifier si le GO modifie AT₁R et si ces modifications ont un impact sur sa signalisation.

1.7 Glycation du récepteur AT₁ de l'angiotensine II

La question est donc de savoir si AT₁R, en condition d'hyperglycémie et donc en présence de fortes concentrations de GO, pourrait-être une cible potentielle dans la formation de PGA puisqu'il est constitué de 22 résidus lysine et 12 résidus arginine potentiellement glyqués. Les conséquences d'une telle glycation pourraient être importantes puisque celles-ci

pourraient avoir un impact sur la liaison de l'AngII, l'activation du récepteur, ou encore le couplage des protéines-G et des β -arrestines.

En effet, les domaines extracellulaires ainsi que les domaines transmembranaires, formant une pochette de liaison pour l'AngII, sont tous deux composés de plusieurs résidus lysine et arginine. Plusieurs acides aminés du récepteur AT₁ sont essentiels pour la liaison de l'AngII et comprennent des résidus polaires ou chargés, localisés dans les domaines transmembranaires et hydrophobes, incluant Lys¹⁰² en haut de la troisième hélice transmembranaire et Lys¹⁹⁹ près du haut de la cinquième hélice transmembranaire (de Gasparo et al. 2000b) (**Figure 10**, résidus de couleur verte). La glycation pourrait encore affecter l'activation du récepteur avec la modification du motif DRY (**Figure 10**, résidu de couleur bleue). En effet, le motif DRY se situe dans le troisième domaine transmembranaire et est composé d'une arginine pouvant lier l'acide glutamique dans le sixième domaine transmembranaire; ceci confère une bonne conformation pour la liaison de l'AngII à AT₁R. L'activation des voies de signalisation G _{α 12/13}, G _{α q}, ERK1/2 et le recrutement des β -arrestines pourraient également être affectés par la glycation car des résidus lysine et arginine sont impliqués dans le couplage et le recrutement de ces protéines (**Figure 10**, résidus de couleur mauve et rouge). Nous retrouvons également un groupement palmitoyl en queue C-terminale qui permet de lier la queue à la membrane plasmique, ainsi formant une quatrième boucle. Celle-ci est constituée de plusieurs lysines et arginines qui pourraient être modifiées suite à une exposition au GO. De plus, le résidu Tyr⁴ de l'AngII pourrait potentiellement interagir avec l'Arg¹⁶⁷ au niveau du haut de la quatrième hélice transmembranaire et être glyqué (**Figure 10**, résidu de couleur verte) (Yamano et al. 1995a).

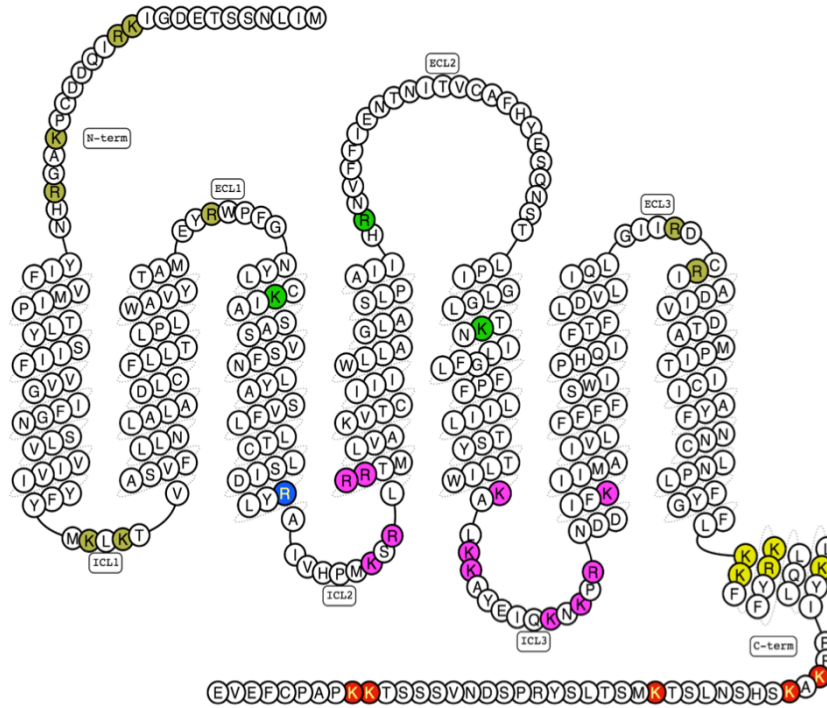


Figure 10: Les résidus d'AT₁R potentiellement modifiés par le GO et les voies de signalisation canoniques du récepteur. Diagramme à serpent d'AT₁R humain montrant les 22 lysines et 12 arginines impliquées dans la liaison de l'agoniste (vert), l'activation du récepteur (bleu), le couplage des protéines-G (mauve) et la liaison des β-arrestines (rouge). L'hélice VIII (jaune) joue un rôle potentiel de senseur de l'environnement lipidique.

2. HYPOTHÈSE/PROBLÉMATIQUE

La modification des résidus lysine et arginine d'AT₁R par le GO est susceptible d'affecter la liaison de l'agoniste au récepteur, son activation, ou encore le couplage des protéines-G et des β -arrestines au récepteur.

Objectifs

Objectif #1

Le premier objectif du projet consiste à évaluer l'impact du GO sur la réponse cellulaire médiée par l'AngII à partir d'un essai intégré de la réponse cellulaire.

Objectif #2

Le second objectif consiste à évaluer l'impact du GO sur l'activation des voies de signalisation d'AT₁R par plusieurs essais tels que l'essai commercial AlphaScreen SureFire pour la mesure de la réponse ERK1/2, l'essai IP-One pour la mesure de l'activation de la voie G_q et le BRET pour la mesure de l'activation de la voie G_q et β -arrestine,

Objectif #3

Le troisième objectif a pour but d'observer la glycation d'AT₁R par des expériences d'immunobuvardage et de spectrométrie de masse.

3. MATÉRIEL ET MÉTHODE

3.1 Culture cellulaire

Des cellules HEK293 exprimant de manière stable AT₁R (HEK293-AT₁R) ont été achetées chez Qbiogene, Carlsbad, CA, USA. La lignée cellulaire stable HEK293-AT₁R a été maintenue dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's media), enrichi avec 10% de sérum de veau fœtal bovin (FBS) inactivé par la chaleur, 5 mM de glucose, 2 mM de L-glutamine, 50 IU ml⁻¹ de pénicilline, 50 µg ml⁻¹ de streptomycine et 0,4 mg ml⁻¹ de G-418 dans un incubateur à 5% de CO₂ à 37°C. Les cellules HEK293 ont été cultivées dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus mais sans G-418. Avant chaque expérience, les cellules ont été cultivées jusqu'à confluence dans des boîtes de Pétri de 10 cm et dans un milieu de culture faible en glucose (5 mM). Elles ont ensuite été traitées avec du glyoxal (GO) 1 mM et du S-p-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester (BBGC) 5 µM dans un milieu de culture sans FBS pendant 6 heures pour l'essai intégré de la réponse cellulaire (impédance) et pour les essais AlphaScreen, IP-One et BRET. Le BBGC est un inhibiteur de GLO-I, une enzyme qui fait partie du système glyoxalase. GLO-I réagit avec les aldéhydes du GO au niveau du cytosol de la cellule et déttoxifie la cellule de ces métabolites. L'inhibition de GLO-I par le BBGC engendre donc une augmentation de la concentration de GO au niveau intracellulaire. En conséquence, le double traitement GO/BBGC, augmente les niveaux extracellulaires et intracellulaires de GO et favorise donc la glycation des protéines cellulaires et du récepteur AT₁.

3.2 Plasmides et constructions de biosenseurs pour les expériences BRET

Le clone d'ADNc pour l'AT₁R humain a été fourni par le Dr Sylvain Meloche (Université de Montréal). La construction AT₁R-GFP10 a été construite en insérant la séquence GFP10 au niveau de l'extrémité C-terminale d'AT₁R, tous deux joints par une séquence de liaison (GSAT) en utilisant le système de clonage In-Fusion PCR, recommandé par le fabricant (Laboratoires Clontech, Mountain View, CA). Les constructions R-LucII-βarr2, Gα12-RlucII, Gαq-RlucII, Gβ1 et Gγ1-GFP10 ont été fournies par le Dr Michel Bouvier de

l'Université de Montréal. Toutes les constructions ont été confirmées par séquençage automatique de l'ADN.

3.3 Transfections et biosenseurs BRET

Pour analyser l'activation des protéines-G, 3 millions de cellules HEK293 ont été cultivées dans des boîtes de Pétri de 10 cm et laissées croître pendant 24 heures dans un milieu contenant du sérum avec 5 mM de glucose. Le jour suivant, les cellules ont été transfectées de manière transitoire avec les biosenseurs suivants: Gaq-RLucII (600 ng), G γ 1-GFP10 (3000 ng) et G β 1 (3000 ng), à l'aide de polyéthylèneimine linéaire (PEI:ADN ratio de 4:1) et de NaCl 150 mM. 24 heures après la transfection, les cellules ont été lavées avec du PBS, détachées avec de la trypsine-EDTA et cultivées dans une plaque blanche opaque à 96 puits pour un total de 75 000 cellules/puits (BD Falcon, Corking, NY, USA). 48 heures suivant la transfection, les cellules ont été privées de sérum et traitées avec du GO 1 mM et du BBGC 5 μ M pendant 6 heures avant d'être stimulées avec une concentration croissante d'AngII. Les cellules ont ensuite été lavées une fois et incubées à température ambiante pendant 1 heure avec du tampon Bret 1X, à l'abri de la lumière. La coelentérazine-400A (5 μ M) a été ajoutée à chaque puit après que les cellules aient été stimulées comme mentionné ci-dessus. Les signaux BRET ont été mesurés à l'aide d'un lecteur de plaque à fluorescence TECAN M1000. Le ratio BRET2 a été calculé par lumière émise par l'accepteur GFP10 par rapport à la lumière émise par le donneur RLucII (**Figure 11**). Le recrutement de la β -arrestine 2 a été réalisé par la transfection de cellules HEK293 avec des plasmides contenant un ADNc codant pour AT1-GFP10 (9000 ng) et RLucII- β -arrestine 2 (300 ng), en utilisant de la polyéthylèneimine linéaire (PEI:ADN ratio de 4:1) et du NaCl 150 mM. Le même protocole que celui utilisé ci-dessus pour les protéines-G a été appliqué. La proximité entre RLuc- β -arrestine 2 et AT1-GFP10 a été évaluée et la mesure de l'activation de la voie G $_q$ et β -arrestine est décrite à la **Figure 11**.

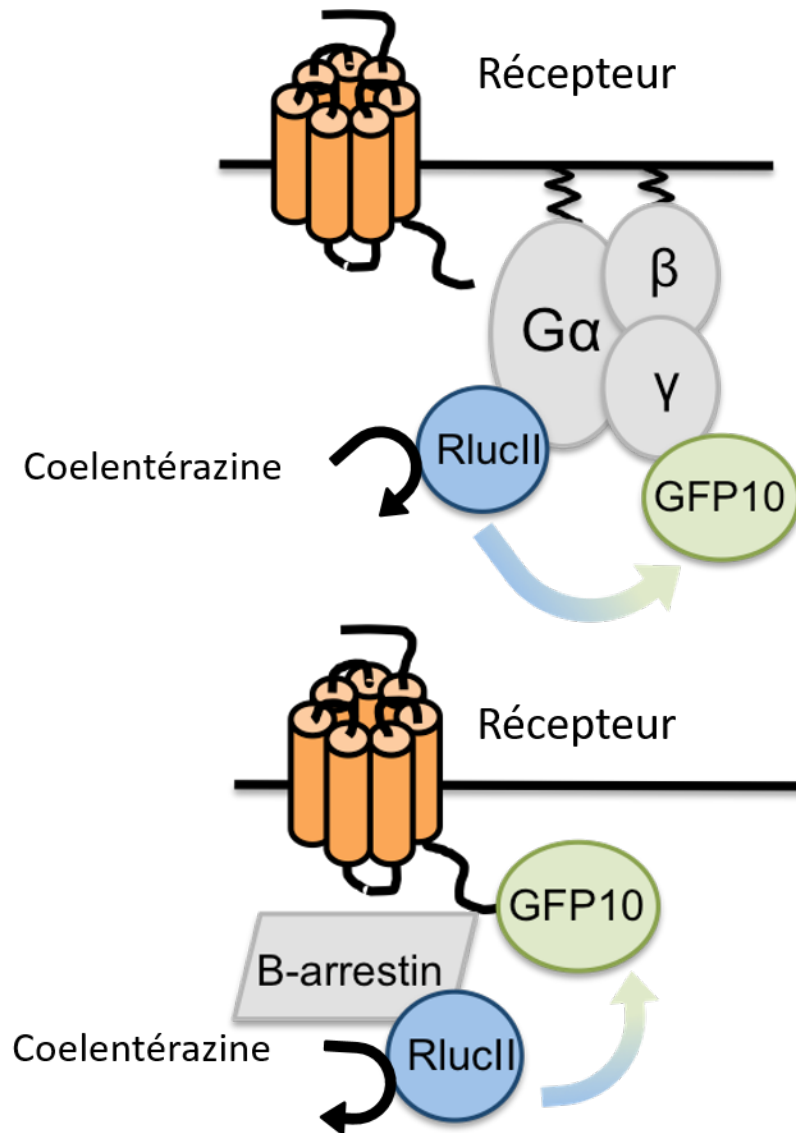


Figure 11: Schéma représentant la mesure de l'activation de la voie G_q et β -arrestine par BRET. Lorsque le donneur (Rluc) et l'accepteur (GFP10) sont à proximité étroite, la dégradation catalytique du substrat de la Rluc, la coelentérazine, permet le transfert d'énergie de résonance de la luciférase à la GFP10 (le BRET), qui à son tour, émet alors une lumière à sa longueur d'onde caractéristique. L'activation de la voie G_q est mesurée par la perte du signal BRET tandis que le recrutement des arrestines est mesuré par un gain du signal BRET. Besserer-Offroy et al., 2017 (Besserer-Offroy et al. 2017).

3.4 Essai intégré de la réponse cellulaire

Les mesures d'impédance électrique de la couche cellulaire ont été effectuées avec le système ZTheta (Applied Biophysics, Troy, NY, USA) utilisant le format plaques à 96 puits, revêtues de Poly-L-Lysine, stabilisées à la cystéine (96w20idf), tel que recommandé par le fabricant. Un total de 60 000 cellules HEK293-AT₁R ont été cultivées dans chaque puit et laissées croître pendant 24 heures dans du DMEM glucose 5 mM avec sérum. Ensuite, les cellules ont été privées de sérum et traitées avec 1 mM GO et 5 μ M BBGC pendant 5 à 6 heures avant la stimulation avec 100 nM AngII ou le véhicule. L'impédance électrique de la couche cellulaire a été enregistrée à la fréquence de 4000 Hz pendant 20 à 30 minutes avant la stimulation afin d'obtenir une ligne de base. La résistance cellulaire a ensuite été mesurée pendant 2 heures après stimulation.

3.5 Essai AlphaScreen

La phosphorylation d'ERK1/2 dans les cellules HEK293-AT₁R a été mesurée avec l'essai commercial AlphaScreen SureFire de Perkin Elmer qui repose sur un système de bille donneur-accepteur et qui est décrit à la **Figure 12**. Les cellules ont étéensemencées dans une plaque à 96 puits pour un total de 100 000 cellules HEK293-AT₁R par puit et elles ont été laissées incubées pendant 24 heures dans un milieu contenant du sérum avec 5 mM de glucose. Le jour suivant, les cellules ont été privées dans un milieu de culture sans rouge de phénol et traitées avec du GO 1 mM et du BBGC 5 μ M pendant 6 heures avant d'être stimulées pendant 0, 5, 10 et 15 minutes avec 100 nM d'AngII pour la mesure de la phosphorylation ERK1/2 en fonction du temps et stimulées avec une augmentation de la concentration en AngII pour les courbes dose-réponse. Les cellules ont ensuite été lysées avec 20 μ L de tampon de lyse 5X, incubées sur un agitateur à plaques à température ambiante pendant 15 minutes à l'abri de la lumière et ensuite congelées à -20°C pendant une nuit. Un total de 4 μ L du lysat a été transféré dans des ProxiPlates à 384 puits (PerkinElmer) et 5 μ L du mélange réactionnel de dosage ont été ajoutés à chaque puit. L'analyse de la plaque a ensuite été effectuée sur un lecteur multilabel Perkin Elmer EnSpire 2300.

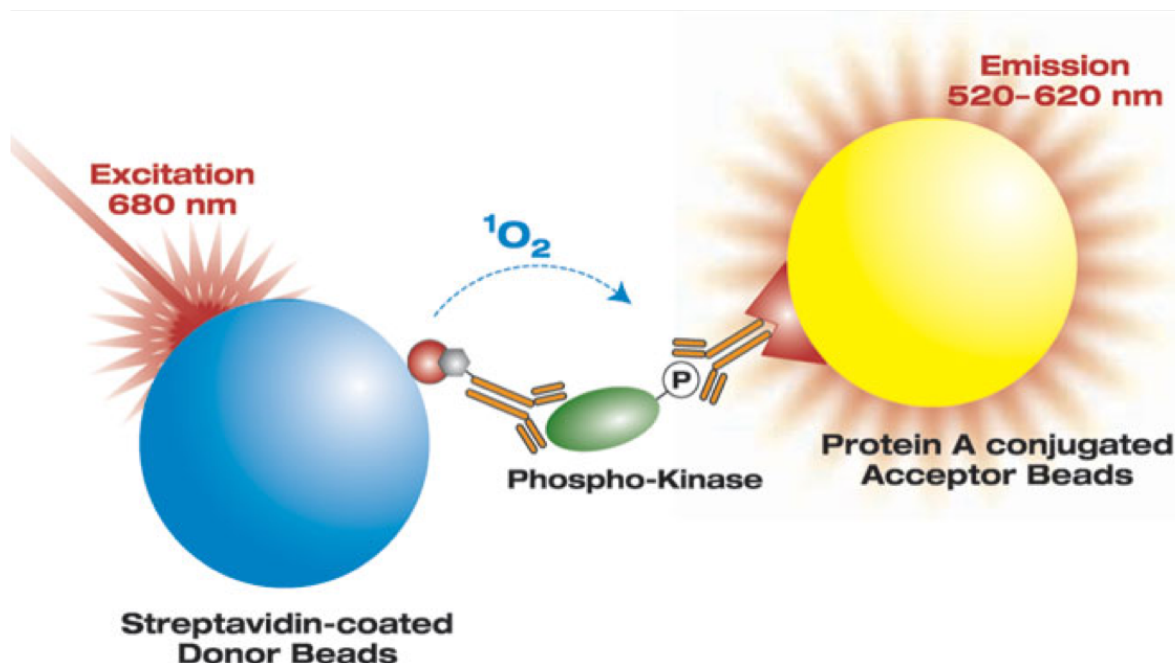


Figure 12: Schéma représentant l'activation de la ERK1/2 évaluée par l'essai commercial AlphaScreen SureFire. La mesure de la réponse ERK1/2 repose sur un système de bille donneuse qui a un anticorps spécifique liant la kinase (ERK1/2) et d'une bille accepteuse qui reconnaît la phosphorylation d'ERK1/2. L'excitation du donneur provoque la relâche d'un radical libre (molécule d'O₂ de courte demi-vie) qui provoque une cascade de transfert d'énergie sur l'accepteur qui lui, émet une lumière à une certaine longueur d'onde. Sittampalam et al., 2016 (Sittampalam et al. 2016).

3.6 L'essai IP-One

Les cellules ont été cultivées dans une plaque à 96 puits pour un total de 50 000 cellules HEK293-AT₁R dans chaque puit et laissées pousser dans un milieu contenant du sérum avec 5 mM de glucose pendant 24 heures. Par la suite, les cellules ont été privées de sérum et traitées avec du GO 1 mM et BBGC 5 µM pendant 6 heures avant d'être stimulées avec 100 nM AngII pendant 30 minutes pour la production des IP₁ en fonction du temps et une concentration croissante en AngII pour des courbes dose-réponse. IP₁-d2 et anti-IP₁ Cryptate ont été ajoutés à chaque puit et les cellules ont été incubées à température ambiante pendant une nuit sous agitation, à l'abri de la lumière. Les lectures ont été effectuées sur un lecteur de plaque GENios Pro avec des filtres HTRF (excitation à 337 nm et émission à 620 et 665 nm). Le rapport TR-FRET a été déterminé par la fluorescence de l'accepteur (665 nm) divisée par la fluorescence du donneur (620 nm) et la mesure de l'activation de la voie G_q avec l'essai IP-One est décrite à la **Figure 13**.

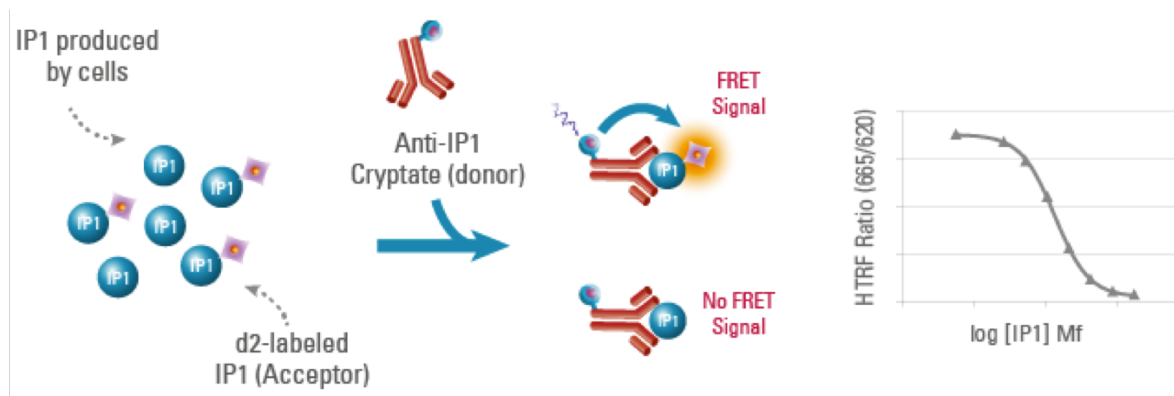


Figure 13: Schéma représentant la mesure de l'activation de la voie G_q avec l'essai IP-One ou Essai de FRET (Förster Resonance Energy Transfer). La mesure de l'activation de la voie G_q , évaluée par la production d'inositol 1-phosphate, repose sur une molécule sur un anticorps, qui lie spécifiquement IP_1 endogène et synthétique. Celle-ci va être excitée et va faire un transfert d'énergie de résonance (FRET) sur l'accepteur, l' IP_1 synthétique, couplé à une molécule fluorescence et qui émet de la lumière. On retrouve une compétition avec l' IP_1 endogène qui n'est pas couplé à une molécule fluorescente et qui ne permet donc pas de FRET et donc, une absence d'émission de lumière. Il y a une diminution du signal FRET lorsqu'on a davantage IP_1 endogène. ("IP-One - Gq Kit | Cisbio" n.d.).

3.7 Expériences de liaison

Les cellules HEK293 exprimant de manière stable AT_1R ont été cultivées dans des boîtes de Pétri de 10 cm dans un milieu de glucose 5 mM jusqu'à atteindre une confluence et ont ensuite été traitées avec du GO 1 mM et du BBGC 5 μ M dans un milieu sans FBS pendant 6 heures. Les cellules ont ensuite été lavées une fois avec du PBS et soumises à un cycle de congélation/décongélation. Ces cellules brisées ont ensuite été grattées doucement dans un tampon de lavage (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 5 mM), centrifugées à 2500xg pendant 15 min à 4°C et remises en suspension dans du tampon de liaison (Tris-HCl 20mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 5 mM, albumine de sérum bovin (BSA) 0,1%, bacitracine 0,01%). Des essais de liaison ont été réalisées en incubant des cellules brisées (5-10 μ g de protéines) pendant 1h à température ambiante avec des concentrations croissantes de ^{125}I -AngII (0,15 à 20 nM) dans un volume final de 200 μ L. La liaison non spécifique a été déterminée en présence de 1 μ M d'AngII non marqué. La radioactivité liée a été séparée du ligand libre à travers des filtres GF/C pré-trempés pendant au moins 3 heures dans du tampon

de liaison. La radioactivité liée aux récepteurs a été évaluée par comptage du rayonnement gamma.

3.8 Expériences d'immunobuvardage

Les cellules HEK293-AT₁R et les cellules HEK293-WT ont été cultivées dans un milieu de culture faible en glucose (5 mM). Elles ont ensuite été privées de sérum et traitées avec du GO 1 mM et/ou BBGC 5 μ M pendant 24 heures. Les cellules ont ensuite été récoltées, lysées et immunoprécipitées avec l'anticorps anti-Flag M2 (1 mg/ml) et immunoblottées contre le carboxyméthyllysine (CML) avec un anticorps anti-CML (1/500) ou anti-flag M2 HRP (1/1000) qui reconnaît l'épitope FLAG (DYKDDDDK) inséré dans la queue N-terminale d'AT₁R.

3.9 Spectrométrie de masse

Les cellules HEK293-AT₁R et les cellules HEK293-WT ont été cultivées dans un milieu de culture faible en glucose (5 mM). Elles ont ensuite été privées de sérum et traitées ou non, avec du GO 1 mM et BBGC 5 μ M pendant 24 heures. Les cellules ont ensuite été lavées et récoltées avec du PBS 1X, et centrifugées pendant 5 minutes à 1000 g. La lyse cellulaire fut ensuite effectuée avec du tampon de Tris 5 mM pH 7.4, EDTA 2 mM + d'inhibiteurs de protéases. Ensuite, nous avons i) effectué une lyse mécanique avec Potter/Dounce pour un total de 30 coups par condition, ii) retiré les débris cellulaires en gardant le surnageant par centrifugeuse (1000 g pendant 20 minutes), iii) centrifugé le surnageant à 31000 g pendant 20 minutes pour obtenir les membranes extraites et nous les avons solubilisé avec le tampon de solubilisation (1% octylglucoside, 75 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM EDTA, 5 mM MgCl₂ et des inhibiteurs de protéases) pendant 40 minutes, iv) lavé les billes Flag M2-agarose magnétiques avec le tampon d'équilibrage (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4). Les billes ont alors été ajoutées à la préparation de membranes pendant 24 heures. v) Les complexes ont été lavés à l'aide du tampon de solubilisation et d'un tampon ammonium bicarbonate (20 mM ammonium bicarbonate pH 8,0). Finalement, les échantillons ont été conservés à -20 °C dans le tampon ammonium bicarbonate. La préparation des échantillons,

la digestion en solution, la préparation et desselage d'échantillons par ZipTips, ainsi que le support bioinformatique pour la recherche et quantification des protéines ont été effectuées par Dominique Lévesque, M.Sc., assistant de recherche dans le laboratoire du professeur François-Michel Boisvert, à la plateforme de protéomique de l'Université de Sherbrooke.

3.10 L'analyse des données

Les données des courbes dose-réponse (EC_{50} et E_{max}) et les données des essais de liaison (B_{max} et K_d) ont été analysées avec GraphPad Prism (Logiciel GraphPad, San Diego, Californie, États-Unis) à l'aide d'une analyse de régression non linéaire d'hyperbole à liaison de site unique. Le nombre d'expériences est décrit dans chaque légende des figures. Les analyses statistiques ont été effectuées par un Test de Student non-apparié, à l'aide de GraphPad Prism 6 et sont décrites dans la légende des figures dans le cas échéant.

Une valeur est considérée comme statistiquement significative lorsque $P < 0,05$.

La réponse normalisée en impédance a été calculée en divisant la résistance de la monocouche cellulaire par la résistance au moment de la stimulation.

4. RÉSULTATS

4.1 L'exposition des cellules HEK293-AT₁R aux traitements GO/BBGC modifie la réponse cellulaire médiée par l'AngII

Puisqu'aucune information n'a été rapportée dans la littérature sur l'effet du GO sur la signalisation du récepteur AT₁R, nous avons voulu, dans un premier temps, quantifier la réponse cellulaire résultant de l'activation de cellules HEK293-AT₁R cultivées dans du glucose 5 mM, avec une stimulation de 100 nM d'AngII, en présence ou en l'absence de traitement avec GO/BBGC. À cette fin, nous avons utilisé un essai intégré de la réponse cellulaire à l'aide d'un système de mesure d'impédance de couche cellulaire (ECIS, Applied Biophysics). Les cellules HEK293 exprimant AT₁R de façon stable ont été cultivées dans une plaque de 96 puits jusqu'à confluence, chaque puit étant constitué d'une électrode en or. La plaque a ensuite été soumise à un voltage qui nous a permis d'obtenir un courant et ainsi l'impédance basale de la couche cellulaire. Les cellules ont ensuite été stimulées avec 100 nM d'AngII ce qui a engendré une perturbation de la couche cellulaire et donc un changement de son impédance et qui représente la réponse mesurée.

La ligne de base est le courant soumis aux cellules exprimant AT₁R qui nous permet d'avoir un niveau de résistance à l'état d'équilibre, suivi de la stimulation des cellules avec 100 nM d'AngII qui nous donne une réponse, soit un changement de la résistance en fonction du temps. Deux phases distinctes sont définies dans le graphique : la phase I, caractérisée par la contraction des cellules suite à l'ajout de 100 nM d'AngII, causant une augmentation de courant et une diminution de la résistance. La phase II est plutôt caractérisée par une extension des cellules. Les cellules retournent à leur état basal, ce qui engendre une diminution graduelle du courant et donc une augmentation de la résistance de la couche cellulaire (**Figure 14**).

Une expérience de SPR (*Surface Plasmon Resonance*) a été réalisée dans une étude subséquente dans notre laboratoire dans le but de quantifier en temps réel la réponse cellulaire de cellules HEK293-AT₁R après stimulation avec 100 nM d'AngII. La réponse mesurée en SPR est essentiellement la même que celle mesurée en impédance (Lavenus et al. 2018). Le but de cette expérience était d'identifier la contribution des voies de signalisation dans le profil de la réponse cellulaire et ce, à l'aide d'inhibiteurs. Lorsque les cellules étaient traitées avec Y27632, un inhibiteur de ROCK ($G_{12/13}$) et stimulées avec 100 nM d'AngII, une diminution de l'amplitude de la phase I a été observée, tandis qu'un traitement avec UBO-QIC, un inhibiteur de G_q , a augmenté l'amplitude de la phase I et diminué l'amplitude de la phase II. L'inhibition de G_q par UBO-QIC a semblé favoriser le couplage de $G_{12/13}$ /Rho/ROCK, associé à la première phase de la réponse (la contraction). UO126, un inhibiteur de MAPK/ERK Kinase, a diminué l'amplitude de la phase II de la réponse SPR (Lavenus et al. 2018). Ainsi, par analogie, nous pouvons attribuer la première phase de la réponse d'impédance à la contribution de la voie $G_{12/13}$ /Rho/ROCK et la deuxième phase de la réponse, à ERK1/2 et G_q -dépendantes suite à l'expérience de SPR (**Figure 14**).

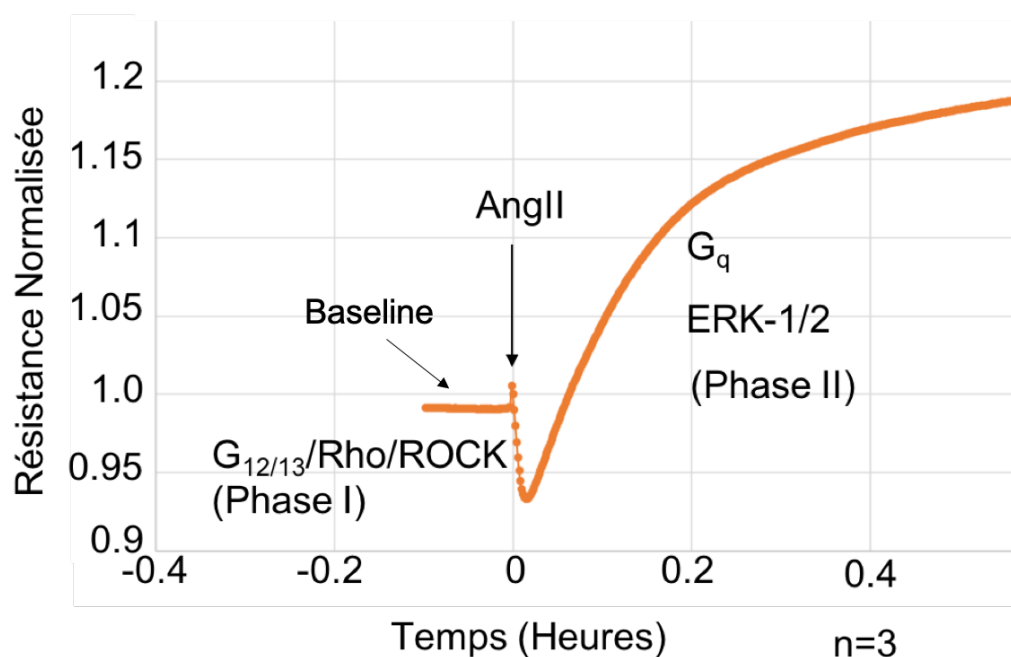


Figure 14: Contribution des voies $G_{12/13}$ /Rho/ROCK, G_q et ERK1/2 en impédance. La première phase du signal (Phase I) est attribuée à la voie $G_{12/13}$ /Rho/ROCK tandis que la deuxième phase de la réponse (Phase II) est attribuée aux voies ERK1/2 et G_q -dépendantes.

Nous avons donc voulu étudier l'impact du GO sur la réponse cellulaire, précisément, l'impact du GO sur le profil de réponse intégré des différentes voies de signalisation avec un essai d'impédance.

Les cellules HEK293-AT₁R ont été cultivées dans une plaque de 96 puits et laissées croître pendant 24 heures, dans un milieu contenant du sérum avec 5 mM de glucose. Les cellules ont été stimulées avec 100 nM d'AngII pour activer AT₁R et générer une réponse en absence de traitement (**Figure 15 A**, courbe orange) ou elles ont été pré-traitées avec 1 mM GO et 5 μ M BBGC et stimulées avec 100 nM d'AngII (**Figure 15 A**, courbe bleu clair). La résistance cellulaire a ensuite été mesurée pendant 2 heures après stimulation. En guise de contrôle, les cellules ont été stimulées avec le véhicule en absence de traitements avec GO/BBGC (courbe bleu foncé). Immédiatement après la stimulation des cellules HEK293-AT₁R avec AngII, on observe une diminution rapide de la résistance normalisée des cellules jusqu'à atteindre une valeur transitoire minimale (**Figure 15 A**, courbe orange), suivi d'une augmentation jusqu'à ce qu'une résistance constante soit atteinte (**Figure 15 B**, courbe orange). Aucun signal de réponse significatif des cellules n'est détecté après stimulation avec un véhicule (DMEM sans sérum). En présence de GO/BBGC et avec stimulation par l'AngII, le profil de la réponse en impédance est similaire, mais la courbe diminue dans les premières et deuxièmes phases de la réponse (**Figures 15 A et B**, courbe bleu clair) par rapport à une absence de traitement (**Figures 15 A et B**, courbe orange). Par conséquent, les traitements GO/BBGC ont un fort impact sur la réponse cellulaire avec une diminution marquée de l'amplitude des phases I et II par rapport à la stimulation de l'AngII seule. En présence du traitement GO/BBGC, la réponse cellulaire est diminuée d'environ **40%** comparée en absence de traitement dans la première phase de la réponse ce qui suggère un impact sur l'activation de la voie G_{12/13}/Rho/ROCK tandis que nous observons une diminution d'environ **25%** de la réponse au niveau de la phase II en présence de GO/BBGC lorsque comparée en absence de traitement dans la deuxième phase de la réponse qui est caractéristique des voies G_q et ERK1/2. Toutefois, les différences observées s'avèrent non-significatives dans les deux phases de la réponse.

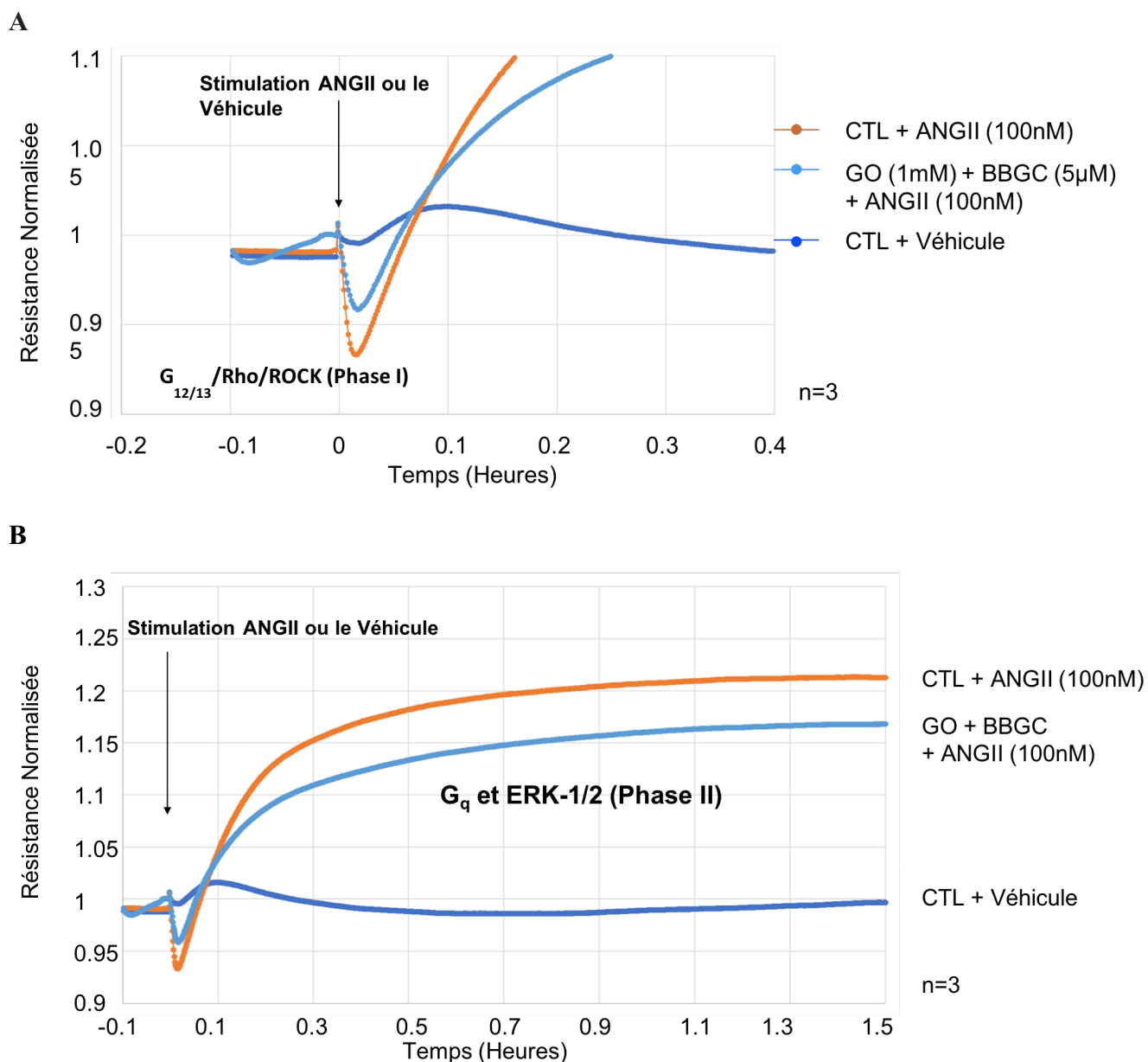


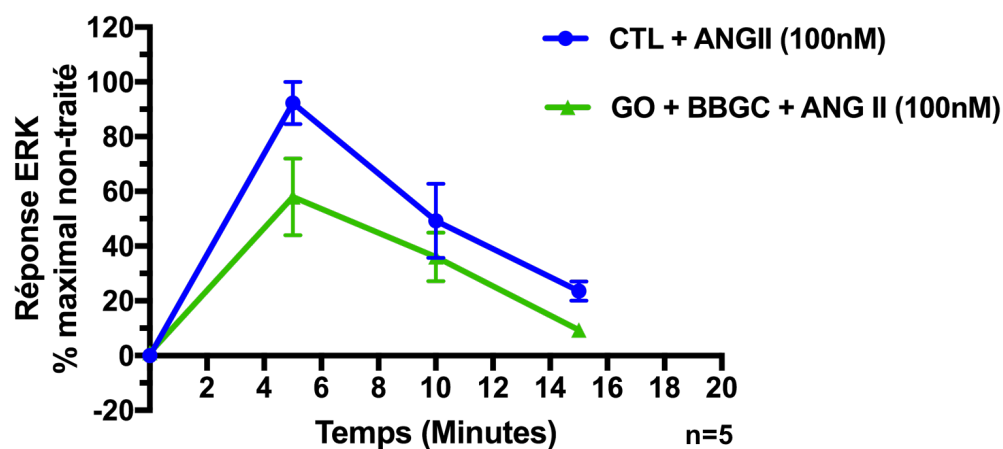
Figure 15: Effet des expositions GO et BBGC sur la résistance de cellules HEK293-AT₁R par impédance. (A) Attribution de la phase I du signal à la voie $G_{12/13}$ /Rho/ROCK. (B) Attribution de la phase II du signal aux voies G_q et ERK1/2. Les cellules HEK293-AT₁R ont été cultivées dans un milieu contenant du sérum avec 5 mM de glucose pré-traitées au non avec GO (1 mM) et BBGC (5 µM). Réponse normalisée des cellules HEK293-AT₁R stimulées par le véhicule (ligne bleu foncé), 100 nM d'AngII en absence de traitements GO (1 mM) et BBGC (5 µM) (ligne orange) et 100 nM d'AngII en présence de GO (1 mM) et BBGC (5 µM) (ligne bleu clair). La flèche sur les deux graphiques représente le temps d'injection du composé. Chaque ensemble de données représente la moyenne de trois expériences indépendantes, chacune réalisée 6 fois, et est exprimé par la moyenne \pm S.E.M.

4.2 Les niveaux de phosphorylation ERK1/2 sont modifiés lorsqu'AT₁R est traité avec GO/BBGC

Comme nous avons observé un changement dans l'essai intégré de la réponse cellulaire en impédance résultant du traitement avec le GO/BBGC, nous avons ensuite cherché à déterminer si l'exposition des cellules au GO a un impact sur le profil d'activation des voies de signalisation d'AT₁R, notamment la voie ERK1/2, avec l'essai AlphaScreen SureFire. Le récepteur AT₁ est connu pour activer la voie des MAP kinases conduisant à la phosphorylation d'ERK1/2 médiée par les PKC (Chiu, Santiskulvong, and Rozengurt 2003). Les RCPG peuvent également induire l'activation d'ERK1/2 par un mécanisme dépendant de la transactivation de l'EGFR (Overland and Insel 2015) et des études récentes suggèrent que les β -arrestines peuvent agir comme des protéines d'échafaudages de la transduction du signal pour l'activation d'ERK1/2, après l'activation du récepteur par un agoniste (Reiter and Lefkowitz 2006). Par conséquent, nous avons évalué si le traitement avec GO/BBGC des cellules HEK293-AT₁R a un impact sur la voie ERK1/2 en mesurant les niveaux de phosphorylation d'ERK en réponse à 100 nM d'AngII. Les cellules HEK293-AT₁R cultivées dans un milieu contenant du sérum avec 5 mM de glucose ont été pré-traitées avec 1 mM GO et 5 μ M BBGC et stimulées avec 100 nM d'AngII pendant 0, 5, 10 et 15 minutes (**Figure 16 A**). Nos résultats révèlent qu'une valeur maximale est atteinte à 5 minutes suivant la stimulation avec AngII, puis les niveaux de phosphorylation d'ERK diminuent jusqu'à 15 minutes. L'ajout de GO et de BBGC aux cellules HEK293-AT₁R semble diminuer le profil de phosphorylation d'ERK1/2 de près de 50%, en particulier à 5 minutes, par rapport à l'absence de traitement (**Figure 16 A**). Nous avons également évalué l'impact du GO sur la phosphorylation d'ERK1/2 par une courbe dose-réponse avec un temps de stimulation de 15 minutes afin d'obtenir les valeurs du EC₅₀ et du E_{max}. Le EC₅₀ est de 0.118 nM en absence de traitement et 0.6 nM en présence de traitement, tandis que le E_{max} est de 98.91% en absence de traitement et 49.16% en présence de traitement. Ces valeurs sont reportées dans le **Tableau 2**. En présence du traitement par le GO/BBGC, un décalage de la courbe dose-réponse est observée (**Figure 16 B**). Ensemble, ce résultat suggère que la puissance et l'efficacité semblent être réduites en présence des traitements GO/BBGC pour la phosphorylation d'ERK1/2 par rapport à l'absence de traitement, bien que les différences

observées soient non-significatives. Le traitement au GO/BBGC semble avoir qu'un effet sur la signalisation mesurée. Ce résultat est en accord avec le résultat de l'essai intégré de signalisation cellulaire qui suggère une diminution de l'activation de la voie ERK1/2-dépendante suite à l'exposition au GO (**Figure 15 B**). Puisque l'activation de la voie ERK1/2 peut se faire de façon dépendante de la protéine G_q , nous avons voulu mesurer l'activation de la voie G_q via l'essai IP-One.

A



B

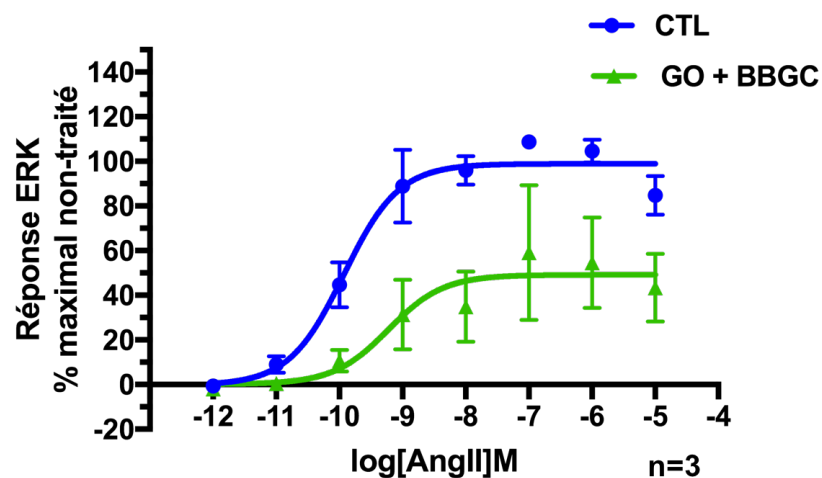


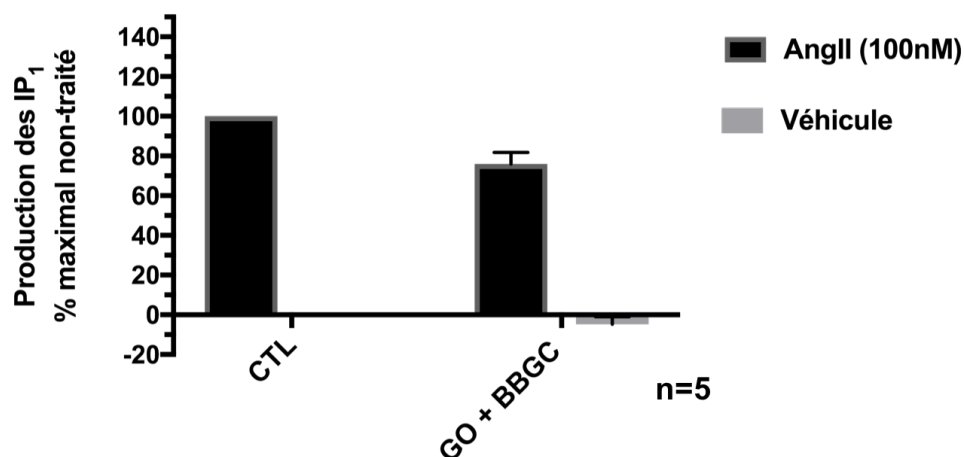
Figure 16: Activation d'ERK1/2 par l'AngII après traitement par GO/BBGC mesurée avec l'essai commercial AlphaScreen SureFire de Perkin Elmer. (A) Mesure de la phosphorylation d'ERK1/2 avec 100 nM d'AngII en présence et en absence de traitement GO (1 mM) et BBGC (5 μ M) pendant 15 minutes. (B) Effet de l'augmentation des concentrations d'AngII sur la phosphorylation d'ERK1/2 en présence et en absence de traitement par GO/BBGC pendant 15 minutes. Chaque ensemble de données représente la moyenne de cinq expériences indépendantes pour la mesure de la phosphorylation ERK1/2 en fonction du temps et de trois expériences indépendantes pour la course dose-réponse, chacune réalisée en triplicata, toutes exprimées en moyenne \pm S.E.M. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du Test de Student non-apparié.

4.3 L'étude de la signalisation en aval des protéines-G révèle un couplage moins fonctionnel avec G_q lorsqu'AT₁R est traité avec GO/BBGC

Nous avons mesuré la signalisation d'AT₁R via la protéine G hétérotrimérique G_q en quantifiant la production d'un second messenger généré par l'activation d'AT₁R avec l'essai IP-One. Nous avons évalué la production d'inositol-1-phosphate (IP₁) et métabolite de l'IP₃ produit lors de l'activation de la protéine $G\alpha_q$ (Vilardaga et al. 2010). Les cellules HEK293-AT₁R cultivées dans un milieu contenant du sérum avec du glucose 5 mM ont été traitées avec du GO (1 mM) et du BBGC (5 μ M) et stimulées avec 100 nM d'AngII ou du DMEM sans sérum pendant 30 minutes selon le protocole de l'essai IP-One qui a suggéré ce temps de stimulation pour permettre une accumulation suffisante d'IP₁ pour pouvoir mesurer le signal FRET ("IP-One - G_q Kit | Cisbio" n.d.). Suivant une exposition des cellules au GO/BBGC, cette exposition semble diminuer de près de 30% la production d'IP₁ après stimulation avec l'AngII, par rapport à une absence de traitement. En présence de GO/BBGC, l'AngII semble être moins efficace pour activer la voie de signalisation des IP₁ (**Figure 17 A**). Nous avons également réalisé des courbes dose-réponse en mesurant la production des IP₁ avec des concentrations croissantes d'AngII pendant 30 minutes afin d'obtenir les valeurs du EC₅₀ et du Emax. Le EC₅₀ est de 0.57 nM en absence de traitement et de 9.047 nM en présence de traitement, tandis que le Emax est de 98.7% en absence de traitement et 56.38% en présence de traitement. Ces valeurs sont reportées dans le **Tableau 2** et les différences observées s'avèrent non-significatives. Le traitement au GO/BBGC semble avoir qu'un effet sur la signalisation mesurée. L'AngII tend à être moins puissante et moins efficace à activer

la voie de signalisation des IP_1 en présence de GO/BBGC par rapport à une absence de traitement (**Figure 17 B**). Globalement, ces résultats suggèrent que la puissance et l'efficacité semblent être réduites avec la présence des traitements GO/BBGC pour la production des IP_1 par rapport à l'absence de traitement. Ce résultat est en appuie avec le résultat de l'activation d'ERK1/2 (**Figures 16 A et B**) puisque AT_1R est connu pour induire l'activation d'ERK1/2 par des voies dépendantes des PKC (Chiu, Santiskulvong, and Rozengurt 2003), ainsi que le résultat de l'essai intégré de signalisation cellulaire qui suggère une diminution de l'activation des voies ERK1/2 et G_q -dépendantes suite à l'exposition au GO (**Figure 15 B**). Pour valider les résultats observés avec l'essai IP-One, nous avons ciblé les événements de signalisation en amont en mesurant la capacité du récepteur à se coupler à diverses protéines-G telles que G_q , en utilisant l'essai BRET.

A



B

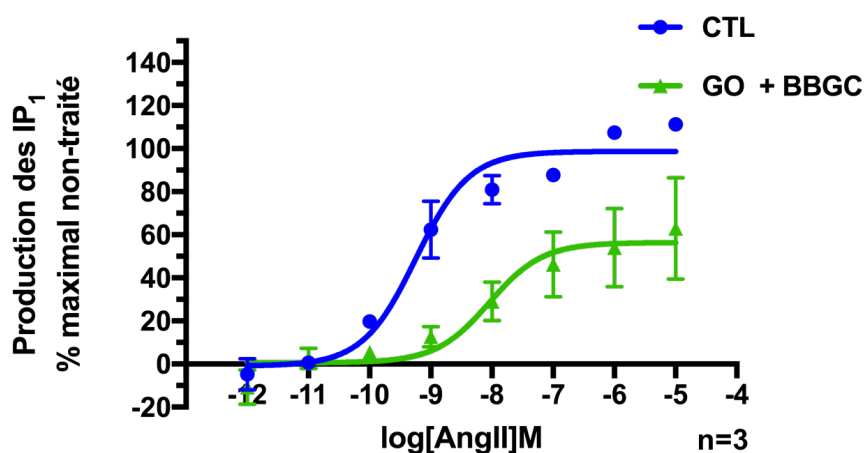


Figure 17: Effet de l'AngII sur la production des IP₁ après traitement par GO/BBGC mesuré par l'essai IP-One. (A) Mesure de la production des IP₁ avec 100 nM d'AngII en présence et en absence de traitement GO (1 mM) et BBGC (5 μ M) jusqu'à 30 minutes. (B) Effet des concentrations croissantes d'AngII sur la production des IP₁ en présence et en absence de traitement par GO/BBGC jusqu'à 30 minutes. Chaque ensemble de données représente la moyenne de cinq expériences indépendantes pour la production des IP₁ en fonction du temps et de trois expériences indépendantes pour la courbe dose-réponse, chacune réalisée en triplicate, toutes exprimées en moyenne \pm S.E.M. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du Test de Student non-apparié.

4.4 L'activation de G_q est réduite en présence des traitements GO/BBGC

Nous avons étudié la capacité d'AT₁R à se coupler à la protéine- $G\alpha_q$ hétérotrimérique par des essais de BRET en transfectant des cellules HEK293 avec les différents biosenseurs $G\alpha_q$ -RLucII, $G\gamma 1$ -GFP10, $G\beta 1$ et le récepteur AT₁R. Les cellules HEK293-AT₁R ont été cultivées dans un milieu contenant du sérum avec du glucose 5 mM et ont été traitées avec du GO (1 mM) et du BBGC (5 μ M). Nous avons mesuré l'activation de la voie G_q pendant 2 minutes par une courbe dose-réponse en stimulant les cellules avec des concentrations croissantes d'AngII. L'augmentation de ces concentrations mène à une augmentation de l'activation de G_q , ce qui a confirmé l'activation d'AT₁R. Une diminution de la puissance semble être observée en présence du traitement avec le GO (1 mM) et BBGC (5 μ M) lorsque comparée au contrôle, caractérisé par une absence de traitement pour l'activation de la voie G_q (**Figure 18**). Les valeurs du EC50 sont de 0.241 nM en absence de traitement et 1.4 nM en présence de traitement, tandis que le Emax est de 103.4% en absence et 110.1% en présence de traitement. Ces valeurs sont présentées dans le **Tableau 2** et les différences observées s'avèrent non-significatives. Le traitement au GO/BBGC semble avoir qu'un effet sur la signalisation mesurée. Il est important de noter que l'on observe un décalage de la courbe dose-réponse en présence du traitement par le GO/BBGC (**Figure 18**), ce qui est en accord avec le résultat pour la production des IP₁ en présence de traitement (**Figure 17 B**).

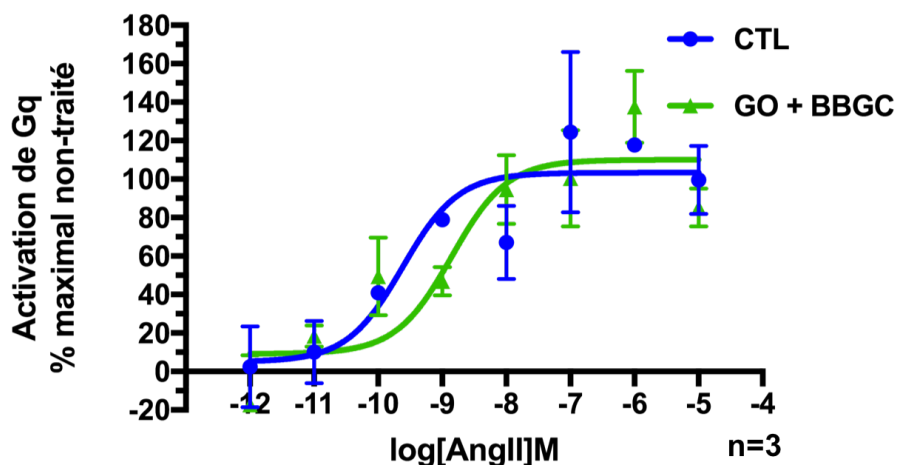


Figure 18: AngII favorise l'engagement de la protéine G_q avec ou sans traitement par le GO/BBGC. Effet des concentrations croissantes d'AngII sur la dissociation de G_q en présence et en absence de traitement par GO/BBGC jusqu'à 2 minutes par BRET. Chaque ensemble de données représente la moyenne de trois expériences indépendantes, chacune réalisée en triplicata, toutes exprimées en moyenne \pm S.E.M. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du Test de Student non-apparié.

4.5 Le recrutement de β -arrestine 2 est réduit en présence des traitements GO/BBGC

Les β -arrestines (β arrs), en revanche, sont connues pour leur capacité à désensibiliser les RCPG et à réguler un large éventail de fonctions cellulaires (Lefkowitz, Rajagopal, and Whalen 2006). De nouveau, nous avons utilisé un essai BRET pour mesurer le recrutement de RLucII- β -arrestine 2 à AT1-GFP10 dans les cellules HEK293 transfectées de manière transitoire avec des plasmides contenant un ADNc codant pour AT1-GFP10 et RLucII- β -arrestine 2, traitées ou non avec GO (1 mM) et BBGC (5 μ M). Nous avons mesuré la capacité de l'AngII à recruter la β -arrestine 2 après l'activation du récepteur avec des concentrations croissantes d'AngII pendant 10 minutes. Le recrutement de la β -arrestine 2 induite par l'activation de l'AngII s'est révélé être dépendant de la concentration (**Figure 19**). Le EC50 est de 3.851 nM en absence de traitement et 20.6 nM en présence de traitement, tandis que le Emax est de 103.3% en absence de traitement et 134.8% en présence de traitement. Ces valeurs sont présentées dans le **Tableau 2** et les différences observées pour le Emax s'avèrent non-significatives; le traitement au GO/BBGC semble avoir qu'un effet sur la signalisation

mesurée. Par contre, le EC50 de la β -arrestine 2 en présence de GO/BBGC, s'avère significatif ($p \leq 0,05$); l'AngII induit un recrutement de la β -arrestine 2 avec une puissance plus faible en présence d'un traitement par le GO par rapport à une absence de traitement.

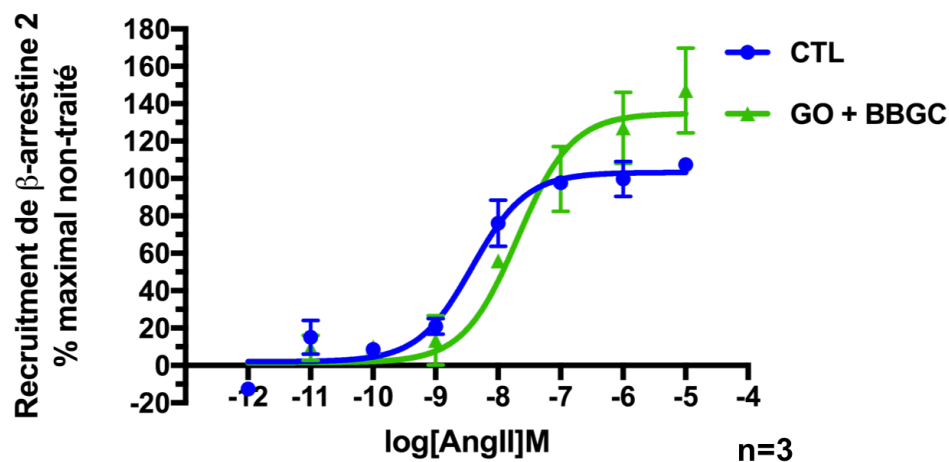


Figure 19: AngII conduit au recrutement de la β -arrestine 2 avec ou sans traitement par le GO/BBGC. Effet de l'augmentation des concentrations d'AngII sur le recrutement de la β -arrestine 2 en présence et en absence de traitement par le GO/BBGC pendant 10 minutes par BRET. Chaque ensemble de données représente la moyenne de trois expériences indépendantes, chacune réalisée en triplicata, toutes exprimées en moyenne \pm S.E.M. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du Test de Student non-apparié.

Tableau 2 : Les valeurs du EC₅₀ et E_{max} pour l'AngII sur les voies de signalisation activées par le récepteur AT₁ en présence et en absence de traitement GO (1 mM) et BBGC (5 µM)

Voies de signalisation	EC ₅₀ , nM ± S.E.M.		E _{max} , % ± S.E.M.	
	Absence de traitement	GO/BBGC	Absence de traitement	GO/BBGC
pERK1/2	0.118, 2.039e-010 ± 1.281e-010	0.600, 4.123e-008± 4.074e-008	98.91, 100 ± 0	49.16, 51.32 ± 18.82
IP ₁	0.570, 8.717e-010 ± 3.909e-010	9.047, 8.685e-009± 3.341e-009	98.70, 100 ± 0	56.38, 56.16 ± 20.17
G _q	0.241, 1.046e-008 ± 8.576e-009	1.400, 9.187e-010± 2.899e-010	103.4, 100 ± 0	110.1, 98.31 ± 13.57
β-arrestine 2	3.851, 3.363e-009 ± 1.94e-009	20.600* , 2.993e-008± 5.413e-009	103.3, 100 ± 0	134.8, 137.8 ± 20.96

* p ≤ 0,05 par rapport à l'absence de traitement dans un test t non apparié (test paramétrique).

Les cellules HEK293 exprimant AT₁R ont été analysées comme décrites dans les procédés ci-dessus. Le EC₅₀ et E_{max} sont exprimés sous la forme de trois expériences indépendantes réalisées en triplicata.

4.6 Propriétés de liaison de l'AngII en présence et en l'absence de traitement par le GO/BBGC

Nous avons évalué les propriétés de liaison de AngII à AT₁R par un essai de liaison, en présence et absence de traitement. Les cellules traitées ou non avec du GO (1 mM) et BBGC (5 µM) ont été incubées avec des concentrations croissantes de ligand radioactif (¹²⁵I-AngII), tandis que la liaison non spécifique a été déterminée en présence de 1 µM d'AngII non marqué pour permettre de mesurer l'affinité, c'est-à-dire la capacité de fixation du ligand radioactif à AT₁R.

Puisque qu'une tendance a été observée, soit une diminution de la puissance en présence de traitement GO/BBGC pour la totalité des essais, ceci suggère que l'affinité pourrait l'être aussi. En effet, l'AngII a montré une affinité de liaison dans la gamme du nanomolaire ($K_d = 4,188$ nM) en présence de GO/BBGC versus un $K_d = 1,394$ nM en absence de traitement. Bien que ces valeurs suggèrent une diminution de l'affinité en présence de GO/BBGC, la différence observée s'avère non-significative. Le traitement GO/BBGC tend à diminuer l'affinité pour la liaison de l'AngII au récepteur AT₁. Comme attendu, la concentration totale de récepteurs (B_{max}) dans les deux conditions est comparable (**Tableau 3**).

Tableau 3 Propriétés de liaison (K_d) de AngII à AT₁R et B_{max} en présence et en absence de traitement GO (1 mM) et BBGC (5 µM)

	K_d , nM \pm S.E.M.	B_{max} , fmol/mg protéine \pm S.E.M.
Absence de traitement	1.394, 3.062 \pm 1.668	2.456, 3.947 \pm 1.491
GO/BBGC	4.188, 3.998 \pm 0.1905	3.372, 3.153 \pm 0.2195

Les affinités de liaison (K_d) et B_{max} sont exprimées en tant que moyenne \pm SEM des valeurs obtenues dans trois expériences indépendantes effectuées en duplicata sur les cellules HEK293 exprimant de manière stable AT₁R.

4.7 Formation de dérivés CML de protéines cellulaires par expériences d'immunobuvardage

Nous avons voulu observer la glycation du récepteur AT₁ par des expériences d'immunobuvardage. Au préalable, dans notre laboratoire, des cellules HEK293 sur-exprimant de façon stable le récepteur AT₁, ont été traitées avec 5 mM glucose et 1 mM GO avec ou sans 1mM d'aminoguanidine (AMG) puis immunoblottées pour détecter la formation de dérivés carboxyméthyllysine (CML) avec un anticorps anti-CML. La formation de dérivés CML a été révélée lorsque les cellules étaient exposées au GO, surtout sur des protéines avec un poids moléculaire au-dessus de 55 kDa et entre 25 et 35 kDa. Le traitement à l'AMG a prévenu la formation de dérivés CML de protéines cellulaires détectées par immunobuvardage (Boucher et al. 2014). En effet, l'AMG bloque les groupements carbonyles réactifs des sucres et prévient la glycation de protéines cellulaires (Sadowska-Bartosz and Bartosz 2015). Puisque le traitement au GO a semblé engendrer la formation de dérivés CML sur les cellules HEK293-AT₁R, il s'avère intéressant à savoir si AT₁R est directement glyqué et si ces dérivés CML sont sur le récepteur même. En effet, plusieurs PGA découlent de l'exposition au GO tels que le CML, le CMA ou encore le G-H (**Tableau 1**). Les résultats d'immunobuvardage et de spectrométrie de masse sont présentés dans la section suivante.

Nous avons voulu étudier le traitement au GO/BBGC sur des cellules HEK293-AT₁R et les cellules HEK293-WT, utilisées comme cellules contrôles, pour étudier si le traitement GO/BBGC permet la formation de dérivés CML de protéines cellulaires au niveau des cellules de type sauvage et des cellules exprimant AT₁R. Les cellules HEK293-AT₁R et les cellules HEK293-WT, ont été cultivées dans un milieu de culture faible en glucose (5 mM). Elles ont ensuite été privées et pré-traitées avec 1 mM GO et/ou 5 µM BBGC pendant 24 heures. Les cellules ont ensuite été récoltées, lysées et immunoblottées contre la modification carboxyméthyllysine avec un anticorps anti-CML. Nous observons sur la membrane d'immunobuvardage, qu'il y a la formation de dérivés CML de protéines cellulaires issues d'une exposition contrôle à une concentration faible en glucose (CTL, 5 mM), puis au glyoxal (GO, 1 mM) et/ou BBGC (5 µM) (**Figure 20**) pour les deux types cellulaires. Par contre, les

cellules WT et AT₁R montrent des patrons différents pour les protéines ayant des modifications CML. En présence de GO, les modifications CML sont augmentées chez les cellules WT mais peu présentes chez les cellules AT₁R. Le traitement BBGC ne forme pas de modifications CML chez les cellules WT mais augmente beaucoup les protéines modifiées CML chez les cellules AT₁R. Il semblerait que l'exposition au GO avec BBGC, augmente autant la formation de dérivés CML de protéines cellulaires chez les deux types cellulaires. En présence de 5 mM glucose, en absence de traitement, ces bandes sont à moins fortes intensités pour les cellules HEK293-WT et HEK293-AT₁R (**Figure 20**).

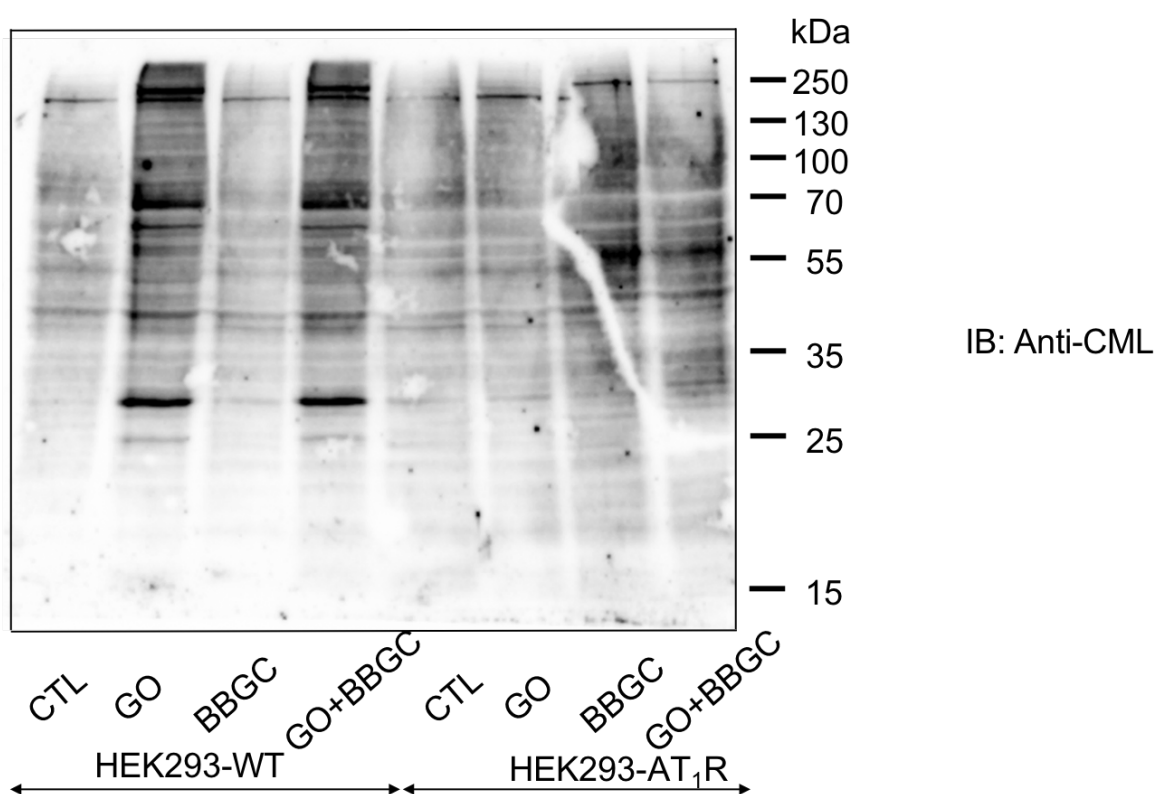


Figure 20: Formation de dérivés CML de protéines cellulaires. Les cellules HEK293-AT₁R qui expriment de manière stable le récepteur AT₁ et les cellules HEK293-WT qui n'expriment pas le récepteur, sont cultivées dans un milieu de culture faible en glucose (5 mM). Elles sont ensuite privées et exposées à 1 mM GO et/ou 5 μ M BBGC pendant 24 heures. Elles sont ensuite récoltées, lysées et immunoblottées contre le carboxyméthyllysine (CML) avec un anticorps anti-CML. Représentatif de n=4.

4.8 Formation de dérivés CML sur AT₁R

Puisque le traitement au GO/BBGC permet la formation de dérivés CML de protéines cellulaires au niveau des cellules de type sauvage et des cellules exprimant AT₁R (**Figure 20**), nous avons voulu dans un deuxième temps, révéler la formation de dérivés CML sur AT₁R, par essais d'immunobuvardage. Les cellules HEK293-AT₁R et les cellules HEK293-WT, utilisées comme cellules contrôles n'exprimant pas AT₁R, ont été cultivées dans un milieu de culture faible en glucose (5 mM). Elles ont ensuite été exposées à 1 mM GO et/ou 5 μ M BBGC pendant 24 heures puis récoltées, lysées, et AT₁R immunoprécipité à l'aide de l'anticorps anti-Flag M2. Nous avons ensuite révélé le récepteur avec un anti-flag M2 HRP pour s'assurer que le récepteur était bel et bien exprimé. Nous observons des bandes avec un poids moléculaire d'environ 61 kDa et 41 kDa (**Figure 21 A**). Le récepteur AT₁ a un poids moléculaire de 41 kDa, ce qui confirme bien l'expression du récepteur chez les cellules HEK293-AT₁R. Comme attendu, cette bande est absente chez les cellules HEK293-WT puisque celles-ci n'expriment pas le récepteur. Puisque le récepteur AT₁ portant l'épitope Flag M2 est bien révélé par immunobuvardage, nous avons donc voulu révéler si AT₁R portait la modification CML. Suite à l'immunoprécipitation d'AT₁R-Flag M2, nous avons détecté la modification CML par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps anti-CML. Nous observons une absence de formation de dérivés CML sur AT₁R lors d'une exposition contrôlée à une concentration faible en glucose (CTL, 5 mM) puis au glyoxal (GO, 1mM) et/ou BBGC (5 μ M) (**Figure 21 B**) chez les cellules HEK293-AT₁R lorsque comparées aux cellules HEK293-WT. Ainsi, nous n'avons pas pu confirmer la modification CML sur AT₁R par essais immunobuvardage.

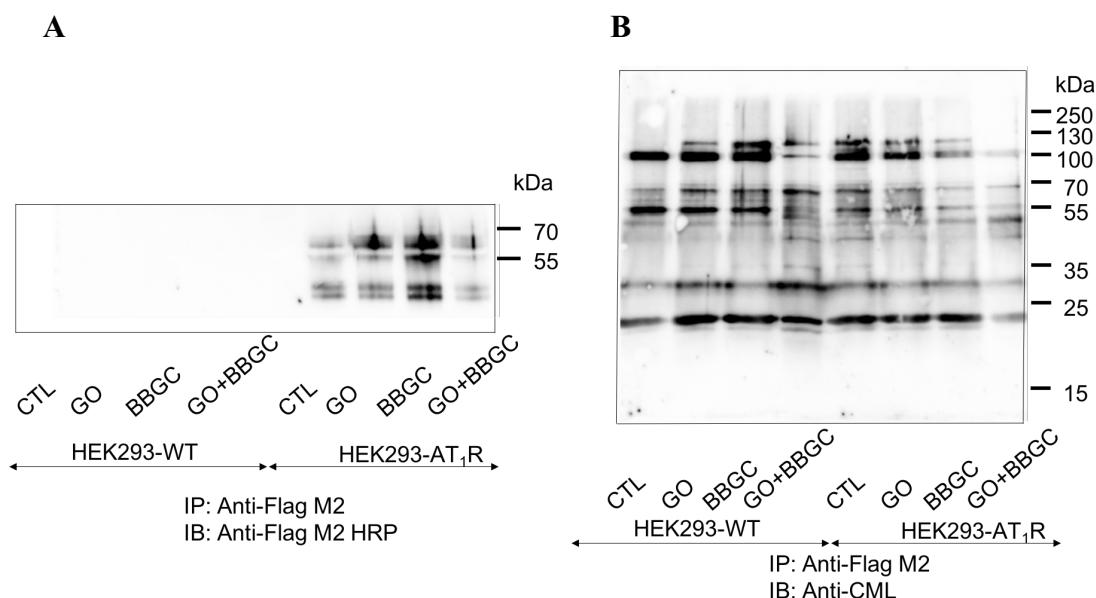


Figure 21: A. Immunoprécipitation du récepteur AT₁. B. Absence de formation de dérivés CML sur AT₁R lors d'une exposition contrôlée à une concentration faible en glucose (CTL, 5 mM) puis au glyoxal (GO, 1 mM) et/ou BBGC (5 μ M). Représentatif de n=3.

4.9 Identification des résidus glyqués sur AT₁R par spectrométrie de masse

Nous avons voulu valider ces résultats négatifs par une méthode alternative utilisant la spectrométrie de masse. Les PGA qui découlent de l'exposition au GO et recherchés sur AT₁R sont le CML ou le CMA, provenant de la réaction du GO avec un résidu lysine ou arginine respectivement et ayant une masse de 58.01 Da, mais encore aussi le G-H qui résulte de la réaction du GO avec un résidu arginine et qui a une masse de 40 Da (Rykær et al. 2017). Deux expériences de spectrométrie de masse ont été réalisées dans les mêmes conditions expérimentales que les essais immunobuvardage présentés à la figure 21. Le premier échantillon a été digéré avec la trypsine tandis que le deuxième échantillon avec la chymotrypsine. L'échantillon digéré avec la trypsine, qui clive les protéines au niveau des résidus lysine et arginine, a permis de révéler la séquence peptidique AIVHPMK SRLRRTML, tandis que le deuxième échantillon digéré avec la chymotrypsine, clivant aux résidus tyrosine, tryptophane, phénylalanine, leucine et méthionine, nous a permis de révéler la séquence peptidique MSTLSYRPSDNVSSSTK d'AT₁R (**Tableau 4**). Ainsi, le récepteur était bien exprimé au niveau des deux échantillons. En effet, nous avons

observé environ 8 peptides du récepteur AT₁, ainsi qu'une couverture de séquence de 19.2%. Seulement les peptides d'intérêt du récepteur sont présentés dans le **Tableau 4**, c'est-à-dire, un peptide contenant un résidu lysine (K) ou arginine (R) dans sa séquence, qui serait potentiellement glyqué. Nous n'avons malheureusement pas pu révéler les modifications CML, CMA ou G-H sur le récepteur pour les deux échantillons digérés avec la trypsine et la chymotrypsine. Les deux peptides d'AT₁R révélés par spectrométrie avec les séquences AIVHPMKSRLRRTML et MSTLSYRPSDNVSSSTK sont intéressants puisque ceux-ci contiennent des arginines (R) impliquées dans le couplage des protéines-G (**Figure 22**, résidus de couleur mauve) et la liaison des β -arrestines (**Figure 22**, résidus de couleur rouge).

Tableau 4 : Séquences révélées d'AT₁R contenant des résidus lysines (K) et arginines (R), digéré avec la trypsine et la chymotrypsine

Protein names	Gene names	Sequence coverage [%]	Molecular weight [kDa]
Type-1 angiotensin II receptor	AGTR1	19.2	41.061
	Sequence	Experiment LG	Experiment GO
	AIVHPMKSRLRRTML	1	-
	MSTLSYRPSDNVSSSTK	-	3

Trypsine
Chymotrypsine

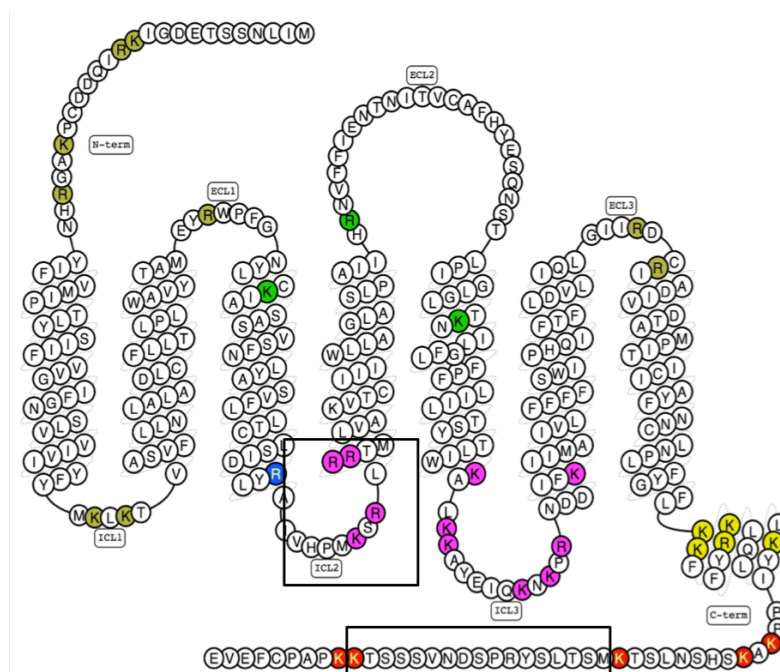


Figure 22: Diagramme à serpent d'AT₁R montrant dans les encadrés les résidus lysine (K) et arginine (R) d'AT₁R révélés par spectrométrie de masse et impliqués dans le couplage des protéines-G (mauve) et la liaison des β-arrestines (rouge).

Bien qu'aucune modification n'ait été détectée sur AT₁R dans l'échantillon digéré avec la trypsine, des PGA ont été retrouvés sur deux récepteurs couplés aux protéines-G ; le récepteur muscarinique M1 (CHMR1) et le récepteur au glucagon (GCGR), tous les deux au niveau de deux arginines (**Tableau 5, les encerclés rouges**). CHMR1 a deux arginines (R) glyquées avec la modification glyoxal hydroimidazolone (G-H) de la séquence DRYFSVTRPLSYRAKRT se situant dans le **deuxième domaine intracellulaire**, reliant le 3^{ème} et 4^{ème} domaine transmembranaire. Le domaine intracellulaire est responsable de la transmission du signal par son couplage aux protéines G. Quant au GCGR, deux R glyquées avec également la modification G-H de la séquence VRGPRGQPWR se situent dans l'extrémité amino-terminale du récepteur ; la liaison du ligand se fait sur cette partie du récepteur. Puisque le récepteur muscarinique et le récepteur au glucagon sont glyqués, il serait intéressant d'évaluer l'impact de la glycation sur les voies de signalisation de ces deux RCPG.

Tableau 5 Modifications glyoxal hydroimidazolone (G-H) sur le récepteur muscarinique M1 et sur le récepteur au glucagon

Protein names	Gene names	Number of hydroimidazolone arginine	Amino acid
Muscarinic acetylcholine receptor M1	CHRM1	2	R
Sequence window			
DRYFSVTRPLS Y R AKRTPRRAALMIGLAWLV			

Protein names	Gene names	Number of hydroimidazolone arginine	Amino acid
Glucagon receptor	GCGR	2	R
Sequence window			
GPDGQWVRG F R GQPWRDASQCQMDGEEIEVQ			

5. DISCUSSION

5.1 Évaluation de la réponse cellulaire suivant l'activation d'AT₁R en présence de GO par un essai intégré de signalisation cellulaire (impédance)

Dans le présent mémoire, nous rapportons que le GO semble avoir un effet sur le profil d'activation des voies de signalisation du récepteur AT₁ stimulé par l'AngII, dans les cellules HEK293. Le GO est un dicarbonylé hautement réactif qui résulte de l'auto-oxydation et de la glycolyse de sucres réducteurs et qui, à son tour, réagit avec les acides aminés libres pour former des PGA. Dans des conditions d'hyperglycémie, le GO réagit avec des résidus lysine et arginine sur les protéines pour former une variété de PGA tels que le carboxyméthyllysine et carboxyméthylarginine respectivement (Cantero et al. 2007), (P J Thornalley, Langborg, and Minhas 1999), (Chetyrkin et al. 2011). Puisqu'AT₁R a un rôle médiateur sur les principaux effets cardiovasculaires de l'AngII et joue un rôle prédominant dans la vasoconstriction et l'hypertrophie cardiaque, nous avons jugé important de déterminer si des niveaux élevés de GO pourraient être impliqués dans le développement d'une hypertension liée à une hyperglycémie chronique. En utilisant un essai intégré de signalisation cellulaire basé sur l'impédance électrique de la couche cellulaire, nous avons mesuré la réponse cellulaire, résultant de l'activation d'AT₁R avec l'agoniste AngII après un co-traitement GO/BBGC. Le BBGC est un inhibiteur de la glyoxalase I (GLO-1) humaine, qui traverse les membranes plasmiques des cellules et est dé-estérifié dans le cytoplasme, ce qui entraîne l'accumulation de GO dans le cytosol des cellules (Takasawa et al. 2008). Les substrats physiologiques de la glyoxalase I sont le méthylglyoxal, le glyoxal et d'autres oxoaldéhydes (P J Thornalley 2003). Le co-traitement avec l'inhibiteur BBGC engendre donc une concentration anormalement élevée en GO dans le cytosol des cellules. Suite à la stimulation par l'AngII des cellules HEK293-AT₁R, nous avons observé un profil de signalisation distinct de la réponse des cellules en impédance, comprenant un déclin rapide de la résistance de la couche des cellules, décrit précédemment comme la phase I. Le minimum transitoire a été suivi d'une augmentation de la résistance des cellules, définie comme phase II (**Figure 14**). En présence de GO et après stimulation par l'agoniste AngII, une diminution de la résistance des cellules a été observée pour les deux phases par rapport à l'absence de

traitement (**Figures 15 A et B**). Dans une étude précédente, le profil de la réponse en SPR (*Surface Plasmon Resonance*) de cellules HEK293 exprimant AT₁R, a été analysé dans une série d'expériences conçues pour attribuer les composantes clés de la signalisation en mettant l'accent sur G_{q/11}, G_{12/13}/Rho/ROCK, ERK1/2 et les β -arrestines, utilisant des inhibiteurs de signalisation (Lavenus et al. 2018). Le test SPR est similaire au test d'impédance et est utilisé pour quantifier en temps réel la réponse des cellules telle que la résistance de la monocouche cellulaire, en fonction du temps. L'utilisation de l'inhibiteur Y27632 a permis de montrer une implication majeure de la voie G_{12/13}/Rho/ROCK dans la première phase de la réponse (Lavenus et al. 2018). Par ailleurs, cette même étude a montré une implication majeure de la signalisation ERK1/2 en phase II de la réponse cellulaire des cellules HEK293-AT₁R lors d'une stimulation avec l'AngII. Puisque les premières et deuxièmes phases de la réponse semblent avoir diminuées après exposition au GO/BBGC (**Figures 15 A et B**) et que le profil de la réponse en impédance des cellules exprimant AT₁R est similaire à celui détectable par SPR, mes résultats laissent présager une possible diminution des voies G_{12/13}/Rho/ROCK, G_{q/11} et ERK1/2 suite à l'effet du traitement GO/BBGC dans la réponse signalétique d'AT₁R.

5.2 Évaluation de l'impact du GO sur l'activation des voies de signalisation d'AT₁R

Puisque le profil de la réponse en impédance des cellules HEK-293AT₁R semble avoir été altéré en présence de GO/BBGC, nous avons voulu étudier de manière plus ciblée, si l'exposition des cellules au GO pourrait altérer le profil d'activation de voies de signalisation spécifiques. En effet, le GO est susceptible d'affecter le couplage d'AT₁R avec les protéines-G et les β -arrestines. Plusieurs voies de signalisation, y compris les voies dépendantes et indépendantes des protéines-G conduisent à la phosphorylation d'ERK1/2 lors de la stimulation avec AngII (Overland and Insel 2015). Nous avons donc évalué l'impact du GO sur cette voie et nous avons observé que l'exposition du GO semble induire une diminution des niveaux de phosphorylation d'ERK1/2 lors d'une stimulation avec 100 nM d'AngII au fil du temps (**Figure 16 A**). De plus, nous avons observé une diminution en termes de puissance et d'efficacité pour la phosphorylation d'ERK1/2 suivant le traitement GO/BBGC, mais ces résultats s'avèrent non significatifs (**Figure 16 B et Tableau 1**). Nous pourrions mettre de l'avant que plus de N pourrait permettre de valider cette tendance et ce, pour l'ensemble des

résultats des voies de signalisation étudiées. L'AngII semble donc moins puissant et efficace pour induire la phosphorylation d'ERK1/2 en présence de GO. Le profil de la réponse en impédance suggère également une possible diminution de l'activation de la voie ERK1/2-dépendante en deuxième phase (**Figure 15 B**). Puisque l'activation de la voie ERK1/2 peut se faire de façon dépendante de la protéine $G_{q/11}$, précisément par la PKC, qui elle, entraîne l'activation de la cascade de kinases Raf, MEK et ERK1/2, nous avons procédé à l'étude de l'activation de la voie G_q lorsqu'AT₁R est traité avec le GO/BBGC par l'essai IP-One. Lors de l'exposition au traitement par le GO, il semblerait qu'une production plus faible d'IP₁ au cours du temps a été observée : l'AngII semble donc moins efficace à activer la voie G_q en présence de GO par opposition à une absence de traitement (**Figures 17 A et B**). Le profil d'activation de la voie de signalisation G_q d'AT₁R étudié en impédance (**Figure 15 B**) est donc cohérent avec la diminution observée de l'activation de G_q par la production des IP₁ et avec la mesure de la phosphorylation d'ERK1/2 qui suggère une diminution de l'activation des voies ERK1/2 suite à l'exposition au GO puisque G_q active ERK. Le GO semble avoir un effet sur le profil d'activation des voies de signalisation d'AT₁R.

Nous avons également évalué l'effet d'une exposition GO/BBGC sur le couplage de G_q au récepteur à l'aide de l'essai BRET. En effet, AT₁R possède plusieurs résidus lysine et arginine dans TM6 et ICL3 qui sont impliqués dans le couplage des protéines-G et qui pourraient potentiellement être modifiés par le GO et devenir une cible pour la formation de PGA. Des concentrations croissantes d'AngII activent G_q avec une puissance qui semble plus faible en présence du traitement GO/BBGC lorsque comparé à une absence de traitements mais les EC₅₀ en présence et en absence de traitement se sont avérés statistiquement non-significatifs (**Tableau 1 et Figure 18**). Cette puissance qui tend à diminuer pour l'activation de G_q est cohérente avec la puissance qui tend à diminuer précédemment déterminée, lorsque l'AngII stimule la phosphorylation d'ERK1/2 en présence d'un traitement par le GO (**Figure 16 B**) puisqu'AT₁R active ERK1/2 via une voie de signalisation dépendante de PKC-Raf-MEK (Chiu, Santiskulvong, and Rozengurt 2003).

Les β -arrestines, quant à elles, se lient aux récepteurs activés par les agonistes et jouent un rôle important dans la médiation de la désensibilisation et de l'internalisation des RCPG (Pierce and Lefkowitz 2001). Dans l'étude SPR mentionnée ci-dessus, des inhibiteurs pharmacologiques et des ARNsi étaient utilisés pour déterminer les implications relatives des composantes de la signalisation d'AT₁R, spécifiquement la contribution des β -arrestines 1 et 2. Les résultats ont démontré que la β -arrestine 2 contribue à la phase II de la réponse SPR dépendante d'AT₁R dans les cellules HEK293 (Lavenus et al. 2018). Nous avons donc étudié, en utilisant un essai BRET, les effets d'un traitement GO/BBGC sur la stimulation d'AT₁R en surveillant le recrutement de la β -arrestine 2 dans AT₁R. Comme attendu, AngII s'est avérée induire un recrutement de la β -arrestine 2 avec une puissance plus faible en présence d'un traitement par le GO par rapport à une absence de traitement ; ce résultat est statistiquement significatif (**Tableau 1 et Figure 19**). Une diminution de cette puissance en présence de GO pour le recrutement de la β -arrestine 2 est en accord avec la puissance précédemment observée dans l'activation d'ERK1/2 induite par l'AngII avec le traitement GO car les β -arrestines agissent comme des protéines d'échafaudage de la transduction du signal pour l'activation d'ERK1/2 après l'internalisation du récepteur stimulé par son agoniste (Pierce and Lefkowitz 2001). Des études récentes indiquent que les MAP kinases, en particulier ERK1/2, constituent le système modèle le plus utilisé pour démontrer le rôle d'échafaudage des β -arrestines dans la signalisation des RCPG. Il a également été démontré que plusieurs types de récepteurs activent ERK1/2 via un mécanisme dépendant de la β -arrestine (Lefkowitz, Rajagopal, and Whalen 2006). Étant donné que les β -arrestines se lient au récepteur AT₁ en C-terminal, cela suggère que les résidus lysine et arginine de la queue cytoplasmique pourraient potentiellement être glyqués.

5.3 Évaluation de l'impact du GO sur les propriétés de liaison de l'AngII à AT₁R

Puisque la puissance tend à diminuer en présence de traitement GO/BBGC pour la totalité des essais de signalisation cellulaire mais que celle-ci n'est pas significative à l'exception du EC50 pour le recrutement de la β -arrestine 2, nous avons voulu vérifier si l'affinité est affectée. Nous avons donc voulu mesurer les propriétés de liaison de l'AngII à AT₁R par un essai de liaison en présence et absence de traitement. L'exposition au GO pourrait

potentiellement affecter la liaison de l'AngII au récepteur AT₁R. Les acides aminés d'AT₁R qui sont essentiels pour la liaison de l'AngII comprennent les résidus polaires ou chargés situés dans les domaines transmembranaires hydrophobes, y compris Lys102 au sommet de l'hélice transmembranaire III et Lys199 près du sommet de l'hélice transmembranaire V (de Gasparo et al. 2000a). Il a été proposé que le résidu Tyr4 de AngII interagisse avec l'Arg167 au sommet de la quatrième hélice transmembranaire (Yamano et al. 1995b). Les traitements GO/BBGC tendent à montrer une plus faible affinité pour la liaison de l'AngII à AT₁R ($K_d = 4,188$ nM) par rapport à une absence de traitement ($K_d = 1,394$ nM) (**Tableau 2**) mais cette plus faible affinité n'est pas statistiquement significative. Ceci suggère tout de même que les résidus lysine et arginine responsables de la liaison de l'agoniste AngII pourraient potentiellement être glyqués. En ce qui concerne la concentration totale de récepteurs dans les échantillons, les traitements GO/BBGC n'ont pas eu d'impact sur le Bmax (**Tableau 2**) par rapport à une absence de traitement.

5.4 Évaluation de la glycation d'AT₁R par des expériences d'immunobuvardage et de spectrométrie de masse

Dans cette étude, il était important d'observer si AT₁R était potentiellement glyqué puisqu'une exposition au GO semble altérer l'ensemble des voies de signalisation étudiées du récepteur ainsi que la liaison de l'agoniste. Il a été démontré dans des études antérieures que plusieurs récepteurs tyrosines kinases (RTK) sont glyqués par des traitements au GO et MGO, notamment le récepteur à l'EGF (EGFR) où on observe la formation de dérivés CML sur EGFR par une exposition au GO et le récepteur à l'insuline où la protéine d'échafaudage IRS est glyquée par le MGO et empêche l'autophosphorylation du récepteur et le recrutement de protéines effectrices responsables de la signalisation (Portero-Otín et al. 2002) (Riboulet-Chavey et al. 2006a). Le récepteur au PDGFβ, quant à lui, est modifié par le GO par la formation de dérivés CML sur PDGFRβ (Cantero et al. 2007). Le GO et le MGO, en condition d'hyperglycémie, peuvent modifier les RTKs et ainsi empêcher l'autophosphorylation du récepteur et le recrutement de protéines effectrices responsables de la signalisation. Nous avons voulu d'abord déterminer si AT₁R est directement glyqué par des expériences d'immunoprécipitation-immunobuvardage sur des cellules HEK293-AT₁R

traitées au GO. Nous avons choisi d'étudier le processus de glycation des cellules HEK293-AT₁R en exposant les cellules au GO, un précurseur des PGA, responsable de la formation des PGA suivant : CML, CMA, dérivé hydroimidazolone (G-H) et le GOLD (**Tableau 1**). Les conditions d'exposition au GO de 1mM pendant 24hrs peuvent générer des niveaux de glycation similaires à ceux qui seraient observés *in vivo* chez les patients diabétiques, tandis que le co-traitement avec l'inhibiteur BBGC a permis une concentration plus élevée en GO intracellulaire. En effet, la concentration de GO plasmatique peut atteindre jusqu'à 4,5 μ M chez des patients diabétiques (Mirza et al. 2007). La concentration et le temps d'exposition au GO sont deux facteurs importants à considérer dans la glycation des protéines. Dans une étude antérieure dans notre laboratoire, la présence de modification CML au niveau de protéines cellulaires a été évaluée par immunobuvardage en utilisant un anticorps dirigé contre la modification CML. Par cette expérience, il a été démontré que plusieurs protéines cellulaires de différents poids moléculaires étaient modifiées par le GO puisqu'il y a des niveaux élevés de l'épitope CML chez les protéines présentes au niveau du lysat cellulaire (Boucher et al. 2014). Nous avons voulu reproduire cette expérience sur des cellules HEK293-AT₁R cultivées dans 5 mM glucose ; l'exposition au GO, avec ou sans BBGC, a augmenté la formation de dérivés CML de protéines cellulaires chez les cellules HEK293-WT et chez les cellules HEK293-AT₁R (**Figure 20**). Puisque le traitement au GO et BBGC semble bel et bien augmenter les produits de glycation par la production de dérivés-CML sur les protéines, nous avons, dans un deuxième temps, immunoprécipiter le récepteur et voir si celui-ci est directement glyqué en utilisant un anticorps dirigé contre le composé CML. Le récepteur est bien exprimé dans les cellules HEK293-AT₁R (**Figure 21 A**) mais il n'a pas été possible de révéler les dérivés CML sur le récepteur (**Figure 21 B**). Le récepteur ne semble pas être directement glyqué ; toutefois, le GO semble avoir un effet sur le profil d'activation des voies de signalisation d'AT₁R, démontrées auparavant avec les différents essais utilisés. La glycation pourrait se faire au niveau des protéines effectrices responsables du signal directement et non sur le récepteur même. La glycation et son impact dépendra de la localisation du groupement amine modifié et de l'impact de cette modification sur la structure des protéines (Jensen 2004). Nous avons ensuite opté pour une méthode plus sélective en utilisant la spectrométrie de masse et en ciblant sur AT₁R la présence des produits de glycation CML, le CMA et le G-H. Dans la littérature, les modifications oxydatives associées

avec un changement de la composition et de la masse sont caractérisées pour ces trois PGA : une augmentation de 58 kDa (+2H, +2C, +2O) pour le CMA et CML et une augmentation de 40 kDa (+2H, +2C, +1O) pour le G-H (Rykær et al. 2017). Malheureusement aucune de ces modifications n'a été retrouvée sur le récepteur (**Tableau 4**) incluant les deux séquences peptidiques identifiées, composées de résidus lysine et arginine impliqués dans le couplage des protéines-G (AIVHPMKSRLRRTML) et la liaison des β -arrestines (MSTLSYRPSDNVSSSTK). Fait intéressant, dans le même échantillon, les modifications hydroimidazolone se trouvent sur deux autres RCPG : le récepteur au glucagon au niveau du deuxième domaine intracellulaire et le récepteur muscarinique M1 sur l'extrémité amino-terminale (**Tableau 5**). L'impact de ces modifications sur la fonction de ces deux RCPG dépasse largement le cadre de mes travaux, mais pourrait néanmoins ouvrir la porte à l'étude de nouveaux mécanismes contribuant à la pathologie du diabète.

6. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En conclusion, nos résultats suggèrent que le traitement au GO/BBGC semble avoir un effet sur les effecteurs de la signalisation d'AT₁R comme nous le voyons dans la totalité des essais effectués pour étudier les voies de signalisation d'AT₁R ; la puissance, l'affinité et l'efficacité pour les voies de signalisation d'AT₁R étudiées en présence de GO, ainsi que l'activation des voies de signalisation en impédance sont résumées à la **Figure 23**.

En présence du traitement GO, l'affinité de l'AngII pour AT₁R tend à être plus faible si on la compare à une absence de traitement (**Figure 23**, premier encadré, résidus de couleur verte). La puissance semble aussi être diminuée suivant le traitement GO/BBGC pour la phosphorylation d'ERK1/2, la production des IP₁, l'activation de G_q et le recrutement de la β -arrestine 2 (**Figure 23**, premier encadré, résidus de couleur verte) ; toutefois, seul le résultat du EC₅₀ pour le recrutement de la β -arrestine 2 s'est avéré être significatif. Puisque la puissance tend à diminuer en présence de GO pour l'ensemble des essais, une concentration plus élevée d'AngII est nécessaire pour engendrer une réponse. Ceci pourrait résulter d'une plus faible liaison de l'AngII au récepteur en présence de GO, ce qui est en accord avec la réduction de l'affinité de l'AngII pour le récepteur. De plus, le traitement GO indique une efficacité moindre pour la phosphorylation d'ERK1/2 et l'activation de G_q (**Figure 23**, deuxième encadré, résidus de couleur mauve); la réponse est diminuée puisque le récepteur n'est pas aussi facilement activé en présence de GO (**Figure 23**).

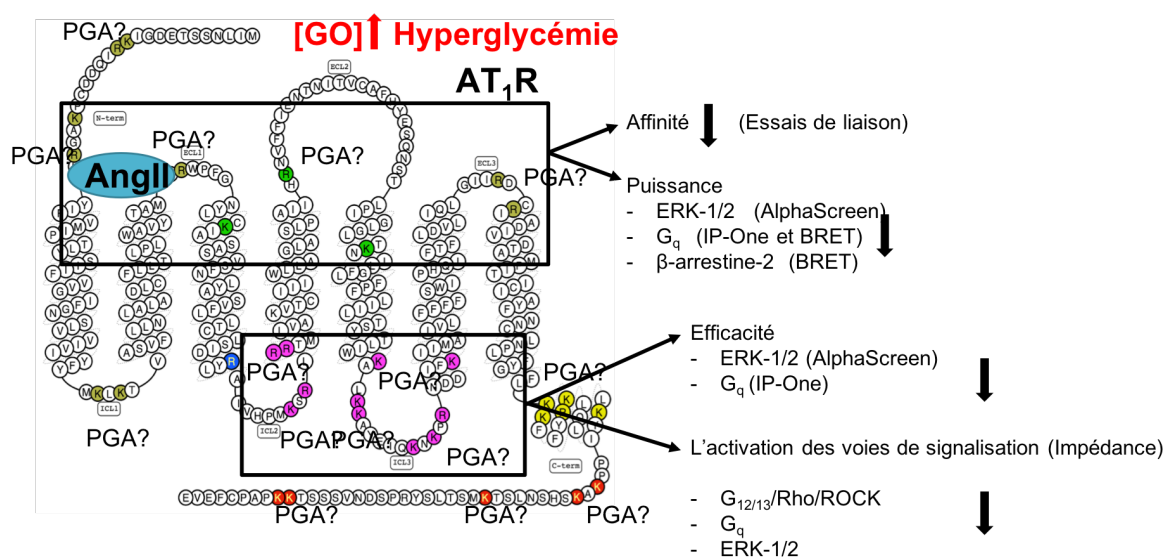


Figure 23: Diagramme à serpent d'AT₁R résumant la puissance, l'affinité et l'efficacité pour les voies de signalisation d'AT₁R étudiées en présence de GO, ainsi que l'activation des voies de signalisation en impédance.

Puisque l'ensemble des voies de signalisation semble être sensible au GO, il a été intéressant d'observer si la glycation est présente sur AT₁R par essais immunobuvardage. L'exposition de cellules HEK293-AT₁R au GO mène à la formation de dérivés CML de protéines cellulaires mais il n'a pas été possible de révéler la formation de dérivés CML sur le récepteur. Nous n'avons pas pu identifier de PGA sur AT₁R par essais immunobuvardage, ni par spectrométrie de masse. Il est important de noter que la glycation pourrait se faire au niveau des biosenseurs des protéines de fusion biosenseurs utilisées ; Gαq-RLucII, Gγ1-GFP10, Gβ1, AT1-GFP10, et RLucII-β-arrestine 2 pourraient être potentiellement modifiées et le traitement au GO/BBGC pourrait altérer leur excitation, émission et interaction.

En perspective, il serait intéressant d'étudier plus en profondeur l'impact de GO sur la voie $G_{12/13}$ /Rho/ROCK, impliquée dans l'activation de la protéine kinase ROCK qui régule le remodelage du cytosquelette (Suzuki, Hajicek, and Kozasa 2009) à l'aide de biosenseurs BRET pour cette voie. Il serait aussi important de pousser davantage les analyses en spectrométrie de masse afin de vérifier à nouveau si des résidus d'AT₁R pourraient être possiblement glyqués par le GO, en utilisant d'autres enzymes de digestion. De plus, puisque la glycation s'est avérée présente par la détection de modifications glyoxal hydroimidazolone (G-H) sur le récepteur muscarinique M1 et le récepteur au glucagon, il serait intéressant d'évaluer la glycation sur les voies de signalisation de ces deux RCPG. Le récepteur au glucagon est particulièrement intéressant à cause de son rôle dans la régulation du glucose dans le sang en liant son agoniste le glucagon ; son effet est inverse à celui de l'insuline qui elle, réduit la concentration de glucose intracellulaire (Weston et al. 2015).

Il serait d'autant plus pertinent d'analyser par les essais d'immunoprécipitation et par spectrométrie de masse, les partenaires qui sont co-immunoprécipités avec AT₁R en présence de GO/BBGC comparé à la condition en absence de traitement. Nous pourrions analyser lesquels de ces partenaires montrent des modifications PGA en présence de GO/BBGC pour définir les mécanismes potentiels impliqués.

7. LISTE DES RÉFÉRENCES

- Allaman, Igor, Mireille Bélanger, and Pierre J Magistretti. 2015. “Methylglyoxal, the Dark Side of Glycolysis.” *Frontiers in Neuroscience* 9: 23. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00023>.
- Antognelli, Cinzia, and Vincenzo Nicola Talesa. 2018. “Glyoxalases in Urological Malignancies.” *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms19020415>.
- Balakumar, P., and G. Jagadeesh. 2014. “Structural Determinants for Binding, Activation, and Functional Selectivity of the Angiotensin AT1 Receptor.” *Journal of Molecular Endocrinology* 53 (2): R71–92. <https://doi.org/10.1530/JME-14-0125>.
- Besserer-Offroy, Élie, Rebecca L. Brouillette, Sandrine Lavenus, Ulrike Froehlich, Andrea Brumwell, Alexandre Murza, Jean Michel Longpré, et al. 2017. “The Signaling Signature of the Neurotensin Type 1 Receptor with Endogenous Ligands.” *European Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.03.046>.
- Boucher, Julie. 2015. “Glycation Des Protéines Intracellulaires : Impact Sur La Fonction Contractile Cellulaire.” <https://doi.org/http://hdl.handle.net/11143/6847>.
- Boucher, Julie, Élie Simard, Ulrike Froehlich, and Michel Grandbois. 2014. “Amplification of AngII-Dependent Cell Contraction by Glyoxal: Implication of Cell Mechanical Properties and Actomyosin Activity.” *Integr. Biol.* 6 (4): 411–21. <https://doi.org/10.1039/C3IB40243F>.
- Campos-Nonato, Ismael, Lucía Hernández-Barrera, Andrea Pedroza-Tobías, Catalina Medina, and Simón Barquera. 2018. “Hypertension in Mexican Adults: Prevalence, Diagnosis and Type of Treatment. Ensanut MC 2016.” *Salud Publica de Mexico*. <https://doi.org/10.21149/8813>.
- Cantero, Anne-Valerie, Manuel Portero-Otín, Victòria Ayala, Nathalie Auge, Marie Sanson, Meyer Elbaz, Jean-Claude Thiers, Reinald Pamplona, Robert Salvayre, and Anne Nègre-Salvayre. 2007. “Methylglyoxal Induces Advanced Glycation End Product (AGEs) Formation and Dysfunction of PDGF Receptor- β : Implications for Diabetic Atherosclerosis.” *The FASEB Journal* 21 (12): 3096–3106. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7536com>.

- Chetyrkin, Sergei, Missy Mathis, Vadim Pedchenko, Otto A. Sanchez, W. Hayes McDonald, David L. Hachey, Hartman Madu, Donald Stec, Billy Hudson, and Paul Voziyan. 2011. "Glucose Autoxidation Induces Functional Damage to Proteins via Modification of Critical Arginine Residues." *Biochemistry* 50 (27): 6102–12. <https://doi.org/10.1021/bi200757d>.
- Chiu, Terence, Chintda Santiskulvong, and Enrique Rozengurt. 2003. "ANG II Stimulates PKC-Dependent ERK Activation, DNA Synthesis, and Cell Division in Intestinal Epithelial Cells." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 285 (1): G1–11. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00419.2002>.
- Cox, M. E., and D. Edelman. 2009. "Tests for Screening and Diagnosis of Type 2 Diabetes." *Clinical Diabetes* 27 (4): 132–38. <https://doi.org/10.2337/diaclin.27.4.132>.
- "Diabetes in Canada - Canada.Ca." n.d.
- Folli, F., M. J. A. Saad, L. Velloso, H. Hansen, O. Carandente, E. Feener, and C. Kahn. 2009. "Crosstalk between Insulin and Angiotensin II Signalling Systems." *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 107 (02): 133–39. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1212088>.
- Forbes, Josephine M., and Mark E. Cooper. 2013. "Mechanisms of Diabetic Complications." *Physiological Reviews* 93 (1): 137–88. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2011>.
- Forbes, Josephine M, Mark E Cooper, Matthew D Oldfield, and Merlin C Thomas. 2003. "Role of Advanced Glycation End Products in Diabetic Nephropathy." *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 14 (8 Suppl 3): S254-8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12874442>.
- Fowler, M. J. 2008. "Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes." *Clinical Diabetes* 26 (2): 77–82. <https://doi.org/10.2337/diaclin.26.2.77>.
- Gasparo, M de, K J Catt, T Inagami, J W Wright, and T Unger. 2000a. "International Union of Pharmacology. XXIII. The Angiotensin II Receptors." *Pharmacological Reviews* 52 (3): 415–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10977869>.
- . 2000b. "International Union of Pharmacology. XXIII. The Angiotensin II Receptors." *Pharmacological Reviews* 52 (3): 415–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10977869>.
- Gress, Todd W., F. Javier Nieto, Eyal Shahar, Marion R. Wofford, and Frederick L. Brancati.

2000. "Hypertension and Antihypertensive Therapy as Risk Factors for Type 2 Diabetes Mellitus." *New England Journal of Medicine* 342 (13): 905–12. <https://doi.org/10.1056/NEJM200003303421301>.
- Grune, Tilman, Betül Catalgol, and Tobias Jung. 2012. *Protein Oxidation and Aging*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118493038>.
- Hu, Jianxin, Yan Wang, Xiaohong Zhang, John R Lloyd, Jian Hua Li, Joel Karpik, Stefano Costanzi, and Jürgen Wess. 2010. "Structural Basis of G Protein–Coupled Receptor–G Protein Interactions." *Nature Chemical Biology* 6 (7): 541–48. <https://doi.org/10.1038/nchembio.385>.
- Huang, Shaohui, and Michael P. Czech. 2007. "The GLUT4 Glucose Transporter." *Cell Metabolism*. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.03.006>.
- Hunyady, László, and Kevin J. Catt. 2006a. "Pleiotropic AT₁ Receptor Signaling Pathways Mediating Physiological and Pathogenic Actions of Angiotensin II." *Molecular Endocrinology* 20 (5): 953–70. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0536>.
- . 2006b. "Pleiotropic AT₁ Receptor Signaling Pathways Mediating Physiological and Pathogenic Actions of Angiotensin II." *Molecular Endocrinology* 20 (5): 953–70. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0536>.
- "IP-One - Gq Kit | Cisbio." n.d. Accessed September 14, 2019. <https://ca.cisbio.net/ip-one-gq-kit-40451>.
- Jeng, Chi-Juei, Yi-Ting Hsieh, Chung-May Yang, Chang-Hao Yang, Cheng-Li Lin, and I-Jong Wang. 2016. "Diabetic Retinopathy in Patients with Diabetic Nephropathy: Development and Progression." Edited by Radouil Tzekov. *PLOS ONE* 11 (8): e0161897. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161897>.
- Jensen, Ole Nørregaard. 2004. "Modification-Specific Proteomics: Characterization of Post-Translational Modifications by Mass Spectrometry." *Current Opinion in Chemical Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2003.12.009>.
- Karin Am Jandeleit-dahm, Christos Tikellis, Christopher M Reid, Colin I Johnston, Mark E Cooper. 2005. "Why Blockade of the Renin–Angiotensin System Reduces the Incidence of New-Onset Diabetes." *Journal of Hypertension* 23 (3): 463–73. <https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000160198.05416.72>.
- Landsberg, Lewis, and Mark Molitch. n.d. "Diabetes and Hypertension: Pathogenesis,

- Prevention and Treatment.” *Clinical and Experimental Hypertension (New York, N.Y. : 1993)* 26 (7–8): 621–28. Accessed November 11, 2018. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15702616>.
- Lange, Jessica N., Kyle D. Wood, John Knight, Dean G. Assimos, and Ross P. Holmes. 2012. “Glyoxal Formation and Its Role in Endogenous Oxalate Synthesis.” *Advances in Urology* 2012 (April): 1–5. <https://doi.org/10.1155/2012/819202>.
- Lapolla, Annunziata, Pietro Traldi, and Domenico Fedele. 2005. “Importance of Measuring Products of Non-Enzymatic Glycation of Proteins.” *Clinical Biochemistry* 38 (2): 103–15. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2004.09.007>.
- Lavenus, Sandrine, Élie Simard, Élie Besserer-Offroy, Ulrike Froehlich, Richard Leduc, and Michel Grandbois. 2018. “Label-Free Cell Signaling Pathway Deconvolution of Angiotensin Type 1 Receptor Reveals Time-Resolved G-Protein Activity and Distinct AngII and AngIIIIV Responses.” *Pharmacological Research* 136 (October): 108–20. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2018.06.027>.
- Lefkowitz, Robert J., Keshava Rajagopal, and Erin J. Whalen. 2006. “New Roles for β -Arrestins in Cell Signaling: Not Just for Seven-Transmembrane Receptors.” *Molecular Cell* 24 (5): 643–52. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2006.11.007>.
- Maessen, Dionne E M, Coen D A Stehouwer, and Casper G Schalkwijk. 2015. “The Role of Methylglyoxal and the Glyoxalase System in Diabetes and Other Age-Related Diseases.” *Clinical Science (London, England: 1979)* 128 (12): 839–61. <https://doi.org/10.1042/CS20140683>.
- “Maladies Cardiovasculaires | Le Portail Canadien Des Pratiques Exemplaires - PCPE.” n.d.
- Mehta, Puja K., and Kathy K. Griendling. 2007. “Angiotensin II Cell Signaling: Physiological and Pathological Effects in the Cardiovascular System.” *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 292 (1): C82–97. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00287.2006>.
- Meyts, Pierre De. 2000. *The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network*. Endotext. MDText.com, Inc. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27512793>.
- Mirza, Muhammad A., Abdul J. Kandhro, Saima Q. Memon, Muhammad Y. Khuhawar, and Rafee Arain. 2007. “Determination of Glyoxal and Methylglyoxal in the Serum of Diabetic Patients by MEKC Using Stilbenediamine as Derivatizing Reagent.”

- ELECTROPHORESIS* 28 (21): 3940–47. <https://doi.org/10.1002/elps.200700129>.
- Murata, T, R Nagai, T Ishibashi, H Inomuta, K Ikeda, and S Horiuchi. 1997. “The Relationship between Accumulation of Advanced Glycation End Products and Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Human Diabetic Retinas.” *Diabetologia* 40 (7): 764–69. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9243096>.
- Niwa, Toshimitsu, Tomoyuki Katsuzaki, Yayoi Ishizaki, Fumitaka Hayase, Takashi Miyazaki, Toshihiko Uematsu, Noriyuki Tatemichi, and Yoshifumi Takei. 1997. “Imidazolone, a Novel Advanced Glycation End Product, Is Present at High Levels in Kidneys of Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes.” *FEBS Letters*. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00362-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00362-1).
- Overland, Aaron C, and Paul A Insel. 2015. “Heterotrimeric G Proteins Directly Regulate MMP14/Membrane Type-1 Matrix Metalloprotease: A Novel Mechanism for GPCR-EGFR Transactivation.” *The Journal of Biological Chemistry* 290 (16): 9941–47. <https://doi.org/10.1074/jbc.C115.647073>.
- Petrie, John R, Tomasz J Guzik, and Rhian M Touyz. 2018. “Diabetes, Hypertension, and Cardiovascular Disease: Clinical Insights and Vascular Mechanisms.” *The Canadian Journal of Cardiology* 34 (5): 575–84. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2017.12.005>.
- Pierce, Kristen L., and Robert J. Lefkowitz. 2001. “Classical and New Roles of β -Arrestins in the Regulation of G-PROTEIN-COUPLED Receptors.” *Nature Reviews Neuroscience* 2 (10): 727–33. <https://doi.org/10.1038/35094577>.
- Poirier, Luc, and Sheldon W. Tobe. 2014. “Contemporary Use of β -Blockers: Clinical Relevance of Subclassification.” *Canadian Journal of Cardiology*. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2013.12.001>.
- Portero-Otín, Manuel, Reinald Pamplona, Maria Josep Bellmunt, Maria Cristina Ruiz, Joan Prat, Robert Salvayre, and Anne Nègre-Salvayre. 2002. “Advanced Glycation End Product Precursors Impair Epidermal Growth Factor Receptor Signaling.” *Diabetes* 51 (5): 1535–42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11978653>.
- Public Health Agency of Canada. 2010. *Report from the Canadian Chronic Disease Surveillance System : Hypertension in Canada, 2010*. Public Health Agency of Canada. <https://www.canada.ca/en/public-health/services/chronic-diseases/cardiovascular-disease/report-canadian-chronic-disease-surveillance-system-hypertension-canada->

2010.html.

- Rabbani, Naila, and Paul J. Thornalley. 2014. "Dicarbonyl Proteome and Genome Damage in Metabolic and Vascular Disease." *Biochemical Society Transactions* 42 (2): 425–32. <https://doi.org/10.1042/BST20140018>.
- Reiter, Eric, and Robert J Lefkowitz. 2006. "GRKs and Beta-Arrestins: Roles in Receptor Silencing, Trafficking and Signaling." *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 17 (4): 159–65. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2006.03.008>.
- Riboulet-Chavey, Audrey, Anne Pierron, Isabelle Durand, Joseph Murdaca, Jean Giudicelli, and Emmanuel Van Obberghen. 2006a. "Methylglyoxal Impairs the Insulin Signaling Pathways Independently of the Formation of Intracellular Reactive Oxygen Species." *Diabetes* 55 (5): 1289–99. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16644685>.
- . 2006b. "Methylglyoxal Impairs the Insulin Signaling Pathways Independently of the Formation of Intracellular Reactive Oxygen Species." *Diabetes* 55 (5): 1289–99. <https://doi.org/10.2337/DB05-0857>.
- Rodriguez, Carlos J., Katrina Swett, Sunil K. Agarwal, Aaron R. Folsom, Ervin R. Fox, Laura R. Loehr, Hanyu Ni, Wayne D. Rosamond, and Patricia P. Chang. 2014. "Systolic Blood Pressure Levels among Adults with Hypertension and Incident Cardiovascular Events: The Atherosclerosis Risk in Communities Study." *JAMA Internal Medicine* 174 (8): 1252–61. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2014.2482>.
- Ruggiero-Lopez, Daniel, Marc Lecomte, Gérard Moinet, Gérard Patereau, Michel Lagarde, and Nicolas Wiernsperger. 1999. "Reaction of Metformin with Dicarbonyl Compounds. Possible Implication in the Inhibition of Advanced Glycation End Product Formation." *Biochemical Pharmacology* 58 (11): 1765–73. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)00263-4](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00263-4).
- Rykær, Martin, Birte Svensson, Michael J. Davies, and Per Häggglund. 2017. "Unrestricted Mass Spectrometric Data Analysis for Identification, Localization, and Quantification of Oxidative Protein Modifications." *Journal of Proteome Research* 16 (11): 3978–88. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00330>.
- Sadowska-Bartos, Izabela, and Grzegorz Bartosz. 2015. "Prevention of Protein Glycation by Natural Compounds." *Molecules* 20 (2): 3309–34. <https://doi.org/10.3390/molecules20023309>.

- Sherwani, Shariq I., Haseeb A. Khan, Aishah Ekhzaimy, Afshan Masood, and Meena K. Sakharkar. 2016. "Significance of HbA1c Test in Diagnosis and Prognosis of Diabetic Patients." *Biomarker Insights*. Libertas Academica Ltd. <https://doi.org/10.4137/Bmi.s38440>.
- Shin-ichiro Miura, Sadashiva S. Karnik. 1999. "Angiotensin Ii Type 1 and Type 2 Receptors Bind Angiotensin Ii through Different Types of Epitope Recognition." *Journal of Hypertension* 17 (3): 397–404. <https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=10100078>.
- Sittampalam, G, N Coussens, Michelle Arkin, Douglas Auld, Chris Austin, Bruce Bejcek, Marcie Glicksman, et al. 2016. *Assay Guidance Manual*. *Assay Guidance Manual*. <https://doi.org/PMID:22553881>.
- St-Pierre, David. 2017. "Mécanismes de Signalisation d'AT1R Médiés Par Des Analogues Cycliques de l'angiotensine II." <https://doi.org/http://hdl.handle.net/11143/11091>.
- Suzuki, Nobuchika, Nicole Hajicek, and Tohru Kozasa. 2009. "Regulation and Physiological Functions of G12/13-Mediated Signaling Pathways." *Neuro-Signals* 17 (1): 55–70. <https://doi.org/10.1159/000186690>.
- Takasawa, Ryoko, Saki Takahashi, Kazunori Saeki, Satoshi Sunaga, Atsushi Yoshimori, and Sei-ichi Tanuma. 2008. "Structure–Activity Relationship of Human GLO I Inhibitory Natural Flavonoids and Their Growth Inhibitory Effects." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16 (7): 3969–75. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2008.01.031>.
- Tan, Di, Yu Wang, Chih-Yu Lo, and Chi-Tang Ho. 2008. "Methylglyoxal: Its Presence and Potential Scavengers." *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 17 Suppl 1: 261–64. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18296351>.
- Thornalley, P J. 2003. "Glyoxalase I--Structure, Function and a Critical Role in the Enzymatic Defence against Glycation." *Biochemical Society Transactions* 31 (Pt 6): 1343–48. <https://doi.org/10.1042/>.
- Thornalley, P J, A Langborg, and H S Minhas. 1999. "Formation of Glyoxal, Methylglyoxal and 3-Deoxyglucosone in the Glycation of Proteins by Glucose." *The Biochemical Journal* 344 Pt 1 (1): 109–16. <https://doi.org/10.1042/BJ3440109>.
- Thornalley, Paul J., Linda G. Edwards, Yubin Kang, Catherine Wyatt, Nathan Davies, Muhatri J. Ladan, and John Double. 2002. "Antitumour Activity of S-p-Bromobenzylglutathione Cyclopentyl Diester in Vitro and in Vivo." *Biochemical*

- Pharmacology*. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(96\)00059-7](https://doi.org/10.1016/0006-2952(96)00059-7).
- Thornalley, Paul J. 2008. "Protein and Nucleotide Damage by Glyoxal and Methylglyoxal in Physiological Systems--Role in Ageing and Disease." *Drug Metabolism and Drug Interactions* 23 (1–2): 125–50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18533367>.
- Vijan, Sandeep. 2010. "Type 2 Diabetes." *Annals of Internal Medicine* 152 (5): ITC3-1. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-152-5-201003020-01003>.
- Vilardaga, Jean-Pierre, Luigi F Agnati, Kjell Fuxe, and Francisco Ciruela. 2010. "G-Protein-Coupled Receptor Heteromer Dynamics." *Journal of Cell Science* 123 (Pt 24): 4215–20. <https://doi.org/10.1242/jcs.063354>.
- Wautier, Jean-Luc, and Ann Marie Schmidt. 2004. "Protein Glycation." *Circulation Research* 95 (3): 233–38. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000137876.28454.64>.
- Wells-Knecht, K. J., E. Brinkmann, M. C. Wells-Knecht, J. E. Litchfield, M. U. Ahmed, S. Reddy, D. V. Zyzak, S. R. Thorpe, and J. W. Baynes. 1996. "New Biomarkers of Maillard Reaction Damage to Proteins." *Nephrology Dialysis Transplantation*. <https://doi.org/10.1093/ndt/11.suppl5.41>.
- Weston, Cathryn, Jing Lu, Naichang Li, Kerry Barkan, Gareth O. Richards, David J. Roberts, Timothy M. Skerry, et al. 2015. "Modulation of Glucagon Receptor Pharmacology by Receptor Activity-Modifying Protein-2 (RAMP2)." *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.624601>.
- Wetzels, Suzan, Kristiaan Wouters, Casper G. Schalkwijk, Tim Vanmierlo, and Jerome J.A. Hendriks. 2017. "Methylglyoxal-Derived Advanced Glycation Endproducts in Multiple Sclerosis." *International Journal of Molecular Sciences* 18 (2). <https://doi.org/10.3390/ijms18020421>.
- Wieduwilt, M J, and M M Moasser. 2008. "The Epidermal Growth Factor Receptor Family: Biology Driving Targeted Therapeutics." *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 65 (10): 1566–84. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7440-8>.
- Yamano, Y, K Ohyama, M Kikyo, T Sano, Y Nakagomi, Y Inoue, N Nakamura, I Morishima, D F Guo, and T Hamakubo. 1995a. "Mutagenesis and the Molecular Modeling of the Rat Angiotensin II Receptor (AT1)." *The Journal of Biological Chemistry* 270 (23): 14024–30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7775462>.
- . 1995b. "Mutagenesis and the Molecular Modeling of the Rat Angiotensin II

Receptor (AT1).” *The Journal of Biological Chemistry* 270 (23): 14024–30.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7775462>.